

OCENA ZMIENNOŚCI GENETYCZNEJ ORAZ PATOGENNOŚCI WIRUSA GRYPY PTAKÓW PODTYPU H9N2 U WYBRANYCH GATUNKÓW DROBIU

STRESZCZENIE

Grypa ptaków (avian influenza, AI) jest jedną z najważniejszych chorób zakaźnych drobiu o ogólnoświatowym zasięgu występowania i szerokim spektrum gospodarzy. Jest wywoływana przez wirusy występujące w licznych odmianach antygenowych i charakteryzujące się dużą zmiennością genetyczną i fenotypową. Wirusy AI podtypu H9N2 występują endemicznie u drobiu na Bliskim i Dalekim Wschodzie oraz w Afryce, gdzie powodują znaczne straty ekonomiczne. W Europie ogniska H9N2 u drobiu zdarzały się sporadycznie aż do roku 2012. Wtedy to zwiększoną liczbę przypadków zaczęto wykrywać w Niemczech, a w następnych latach obecność wirusa zdiagnozowano również we Włoszech, Wielkiej Brytanii i Polsce. W naszym kraju w 2013 roku zidentyfikowano 4 ogniska H9N2 u indyków, dwa kolejne zostały stwierdzone w 2014 roku.

Pierwszym celem pracy była próba ustalenia źródła pochodzenia wirusów H9N2 wykrytych w Polsce. Analiza filogenetyczna w oparciu o sekwencje całego genomu wykluczyła powiązanie krajowych ognisk z endemią grypy ptaków H9N2 w Azji i Afryce, a bliskie pokrewieństwo z izolatami pochodzącymi od indyków w Europie (szczególnie w Niemczech w latach 2013-2015) wskazuje na ich wspólne źródło pochodzenia, którym jest najprawdopodobniej europejska populacja ptaków dzikich. Z kolei analiza molekularna wykazała szereg zmian w genomie analizowanych wirusów, mogących mieć wpływ na ich adaptację do drobiu grzebiącego. Zmiany te to m. in. delecja w łożdźce neuraminidazy (NA), modyfikacja miejsca cięcia hemaglutyniny (HA), mutacje w HA w obrębie miejsca przyłączania receptorów, czy dodatkowe potencjalne miejsca glikozylacji HA. W genie PA jednego z wirusów z 2014 roku wykryto mutację będącą markerem zjadliwości dla ssaków (PA-T97I), jednak porównanie patogenności dwóch izolatów (z mutacją i bez niej) dla myszy wykazało niską patogenność obu szczepów i brak istotnych różnic, co świadczy o niskim potencjale zoonotycznym badanych wirusów AI H9N2.

Ze względu na pojawienie się nowej odmiany AIV H9N2 podjęto badania mające na celu ocenę jego patogenności dla różnych gatunków drobiu. Badania wykonano dla indyków, przepiórek i kaczek. Ptaki zakażono wirusem, a następnie oceniano przebieg kliniczny, czas i poziom trwania siewstwa, transmisję do ptaków kontaktowych

i serokonwersję. Stwierdzono niską, lecz zróżnicowaną zjadliwość AIV H9N2 dla badanych gatunków drobiu – najwyższą dla indyków, zaś najniższą dla kaczek. U indyków siewstwo trwało najdłużej (do końca trwającego 14 dni doświadczenia), zaś jego poziom był wyższy niż u pozostałych dwóch gatunków. Indyki były również jedynym gatunkiem, u którego obserwowano objawy kliniczne (osowiałość) oraz śmiertelność (padł 1 na 10 zakażonych ptaków). U wszystkich gatunków stwierdzono transmisję wirusa do ptaków kontaktowych i serokonwersję. U kaczek obserwowano siewstwo głównie z kloaki. Natomiast wyższy poziom siewstwa z dróg oddechowych niż z kloaki stwierdzony u przepiórek i indyków świadczy o większym tropizmie wirusa do układu oddechowego u tych gatunków. W połączeniu z bezobjawowym przebiegiem zakażenia gatunki te mogą stanowić „cichy” rezerwuar wirusa.

Kolejnym celem badań była ocena zmienności wirusa u wymienionych gatunków ptaków z zastosowaniem metody głębokiego sekwencjonowania. Badaniu poddano wymazy z jamy dziobowo-gardłowej i kloaki pobrane w 2 i 4 dniu po zakażeniu (dpz). W badanych próbkach określono udział i lokalizację wariantów w populacji wirusa w stosunku do sekwencji konsensusowej izolatu użytego do zakażenia. Stopień złożoności populacji wirusowej określono na podstawie liczby polimorficznych pozycji i entropii Shannona. Wykazana u przepiórek największa różnorodność populacji wirusowej w wymazach z jamy dziobowo-gardłowej, przy jednoczesnym wysokim poziomie siewstwa z układu oddechowego i bezobjawowym przebiegu zakażenia, może wyjaśniać rolę tego gatunku jako „ogniwa pośredniego” w adaptacji wirusa grypy do nowego gospodarza. Duża różnorodność wirusa w wymazach z jamy dziobowo-gardłowej, zwłaszcza u przepiórek i indyków, oraz bardzo niska w wymazach z kloaki od indyków i kaczek, świadczy o silnej presji selekcyjnej działającej na populację wirusową w układzie pokarmowym. Te obserwacje z kolei mogą mieć związek z różnicami w tempie ewolucji wirusów u drobiu i u dzikich ptaków wodnych. Szybsza ewolucja wirusów AI u drobiu grzebiącego, u którego wirus namnaża się przede wszystkim w układzie oddechowym, a transmisja zachodzi głównie drogą kropelkową, może wynikać z dużej heterogenności generowanej w układzie oddechowym. Natomiast u dzikich ptaków wodnych, u których transmisja odbywa się głównie drogą fekalno-oralną, niska różnorodność wydalanego wirusa może być przyczyną wolniejszej ewolucji AIV.

W celu prześledzenia procesu adaptacji AIV do nowego gatunku wykonano serię dziesięciu pasażów AIV H9N2 przez organizm kur SPF, zaś wirus z każdego pasażu poddano głębokiemu sekwencjonowaniu. Badania te umożliwiły zaobserwowanie w czasie rzeczywistym ewolucji wirusa, zarówno jej komponentu losowego (pojawianie się mutacji)

oraz nielosowego (szybkiej selekcji mutacji dających przewagę adaptacyjną). Jedną z nich była mutacja w miejscu cięcia HA (ważny marker adaptacji), identyczna ze zidentyfikowaną w szczepach terenowych. Jej obecność stwierdzono po raz pierwszy w szóstym pasażu jako wariant o udziale ok. 40%, który w następnym pasażu uległ selekcji do poziomu dominującego. Ogółem w trakcie pasażu utrwalilo się osiem mutacji, z których część była obecna w izolacie wyjściowym w postaci wariantów mniejszościowych, zaś inne pojawiły się w trakcie pasażu. Najwyższą różnorodność populacji wirusowej zaobserwowano w izolacie wyjściowym i początkowych pasażach. Selekcja części wariantów obecnych w populacji inokulum oraz wyparcie innych doprowadziło do powstania homogennej populacji wirusa w czwartym pasażu. W kolejnych pasażach złożoność populacji wirusowej uległa zwiększeniu.

Badania wykonane w ramach pracy wykazały, że analiza zmienności wirusa w przebiegu zakażenia u różnych gatunków może przyczynić się do pogłębienia wiedzy na temat mechanizmów rządzących ewolucją i adaptacją wirusów AI, otwierając pole do dalszych badań.

SUMMARY

Avian influenza (AI) is one of the most important poultry diseases with worldwide distribution and a broad spectrum of susceptible hosts. It is caused by viruses occurring in numerous antigenic variants and showing high genetic and phenotypic variability. The AI viruses of the H9N2 subtype are endemic in poultry in the Middle and Far East Asia and in Africa, where they cause significant economic losses. In Europe, H9N2 outbreaks in poultry had occurred sporadically until 2012, when an increased number of cases was detected in Germany. In the following years the virus was also identified in Italy, Great Britain and Poland. In Poland, four outbreaks of H9N2 were reported in turkeys in 2013, two more were detected in 2014.

The first aim of the study was to determine the origin of the viruses detected in Poland. Phylogenetic analysis of the whole genome sequences excluded the relationship with the H9N2 endemicity in Asia and Africa but the close relatedness with isolates from turkeys in Europe (particularly in Germany in 2013-2015) indicates their common origin and points at the European population of wild birds as the primary source of the virus. Molecular analysis showed a number of mutations in the genomes of the analyzed viruses that could enhance their adaptation to gallinaceous poultry. These changes included deletion in the neuraminidase (NA) stalk, modification of the hemagglutinin (HA) cleavage site, mutations within the HA receptor binding site, addition of potential HA glycosylation sites. One of the Polish viruses from 2014 showed a mutation in the PA protein (PA-T97I) which was previously identified as a virulence determinant for mammals. However, the comparison of pathogenicity of the two isolates (with and without the mutation) for mice showed low pathogenicity of both strains and no significant differences between them, indicating low zoonotic potential of the tested H9N2 AIVs.

Due to the emergence of a novel strain of AIV H9N2, studies on the virus pathogenicity for various species of poultry were undertaken. The experiments were carried out in turkeys, quail and ducks. The birds were infected with the virus and the clinical course, duration and level of shedding, transmission to contact birds and seroconversion were evaluated. Generally, the pathogenicity of AIV H9N2 for the studied birds was low, although it varied between the species. The virus showed the highest virulence for turkeys, and the lowest for ducks. In turkeys the longest duration of virus shedding was observed (till the end 14-days experiment), and the average amount of the excreted virus was higher than in the other species. Turkeys were also the only species in which clinical symptoms (lethargy) and mortality (1 of 10 infected birds

died) were observed. Transmission of the virus to contact birds and seroconversion was demonstrated in all tested species. Ducks shed the virus mainly from the cloaca. The higher level of respiratory than cloacal shedding found in quail and turkeys indicates more pronounced tropism of the virus to the respiratory system in these birds. This demonstrates that with asymptomatic course of infection, these species can be a "silent" virus reservoir.

The next objective of the study was to evaluate the virus diversity in the examined bird species using deep sequencing approach. Oropharyngeal and cloacal swabs collected at 2 and 4 days post infection (dpi) were subjected to analysis. Location and frequency of variants in the virus population in relation to the inoculum consensus sequence were determined. The assessment of the virus population complexity was based on the number of polymorphic positions and Shannon entropy. The highest diversity of the viral population in oropharyngeal swabs from quail along with a high level of respiratory shedding and asymptomatic course of infection can help to clarify the role of quail as an intermediate host in the adaptation of AIV. A high virus diversity in oropharyngeal swabs, especially in quail and turkeys, and very low one in cloacal swabs, indicates a strong selection pressure affecting the viral population in the digestive tract. These observations may help to elucidate the ground of differences in the evolutionary rate of viruses in poultry and wild aquatic birds. A faster evolution of AI viruses in gallinaceous poultry, in which the virus replicates primarily in the respiratory system and the transmission occurs mainly by the aerosol route, may result from the high virus heterogeneity generated in the respiratory tract. On the other hand, in wild birds mainly fecal-oral route of transmission is observed, and the low diversity of the excreted virus can explain the slower AIV evolution.

To evaluate the process of adaptation of AIV to new host species, ten passages of AIV H9N2 in SPF chickens were performed and the virus from each passage was subjected to deep sequencing. These studies enabled the observation of evolutionary changes in real time, both the random (emergence of mutations) and non-random components (rapid selection of mutations conferring an adaptive advantage). One of the examples is a mutation at the HA cleavage site (an important marker of adaptation), identical to the one identified in the field strains. It was found for the first time in the sixth passage as a variant of approx. 40%, and in the next passage it was selected and became dominant. Overall, eight mutations were fixed during the passages, some of them were present in the inoculum isolate as minority variants, while other emerged during the passages. The highest diversity of viral population was observed in the inoculum isolate and the initial passages. The selection of some variants present in the population of the inoculum and the elimination of others led to

high homogeneity of virus population in the fourth passage. In the subsequent passages, the complexity of the viral population increased.

The research showed that studies on the diversity of the virus in the course of infection in various species can deepen the knowledge on the mechanisms controlling the evolution and adaptation of AI viruses, opening the field for further investigations.