

Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy w Puławach
Zakład Chorób Drobiu

Justyna Milek-Krupa

**Występowanie gamma- i deltakoronawirusów w populacji dzikich ptaków na terenie
Polski i ich rola w epidemiologii zakażeń koronawirusami drobiu**

Prevalence of gamma- and deltacoronaviruses in the wild bird population in Poland and their
role in the epidemiology of poultry coronavirus infections

Praca doktorska

Promotor pracy:

dr hab. Katarzyna Domańska-Blicharz, prof. instytutu

Promotor pomocniczy:

dr n. wet. Anna Pikula

Zakład Chorób Drobiu

Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy

Recenzenci:

dr hab. Tomasz Stenzel, prof. UWM

Katedra Chorób Ptaków

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski

prof. dr hab. Włodzimierz Meissner

Katedra Ekologii i Zoologii Kręgowców

Wydział Biologii

Uniwersytet Gdański

Puławy, 2021

Streszczenie

Koronawirusy jako zróżnicowana grupa patogenów stanowią poważny problem zdrowotny licznych gatunków ptaków, ssaków w tym człowieka. Patogeny te charakteryzują się dużym stopniem zmienności oraz stosunkowo wysokim potencjałem przełamywania barier międzygatunkowych czego przykładem jest pojawienie się w 2019 roku pandemicznego wirusa SARS-CoV-2. U przedstawicieli gromady *Aves* koronawirusy to przede wszystkim czynniki chorobowe drobiu hodowlanego, które zagrażają zdrowiu i produkcji zwłaszcza w wielkostadnej produkcji drobiu pociągając za sobą olbrzymie straty ekonomiczne. Co ważne, badania ostatnich lat świadczą o dużo większym zróżnicowaniu koronawirusów, które występują u licznych gatunków ptaków wolnożyjących jako infekcje asymptomatyczne. Biorąc pod uwagę duże zróżnicowanie gatunkowe ptaków oraz ich zdolności migracyjne uważa się, iż mogą pełnić rolę nie tylko rezerwuaru gamma i deltaCoV, ale również wektora w rozprzestrzenianiu koronawirusów na znaczne odległości. Ponadto poprzez bliskie bytowanie i kontakt dzikich ptaków z drobiem może dochodzić do wymiany genowej, a w konsekwencji powstawania nowych wariantów CoVs.

Głównym celem niniejszej pracy była ocena występowania gamma- i deltakoronawirusów w populacji dzikich ptaków na terenie Polski oraz ich charakterystyka molekularna. W pierwszy etapie zaadaptowano metodę pankoronawirusową RT-nested PCR, polegającą na amplifikacji 554 nt fragmentu polimerazy odpowiadający domenie nsp12-RdRp. Zastosowana metoda umożliwiła wykrycie materiału genetycznego CoV w 166 próbkach na 3998 przebadanych (4,15%) ptaków wolnożyjących. Wśród 81 przebadanych gatunków, należących do 12 rzędów obecność CoV stwierdzono u 16 gatunków reprezentujących rzędy *Anseriformes*, *Charadriiformes*, *Passeriformes*, *Columbiformes*, *Pelecaniformes*, *Ciconiformes*, *Psittaciformes*. Przeprowadzone badania wykryły obecność wirusa u kolejnych gatunków, wcześniej nie wymienianych jako CoV-dodatnie, tj. u gęsi zbożowej, mewy siwej, bekasa kszyka, rybitwy rzecznej, łyski zwyczajnej oraz szpaka zwyczajnego. Z kolei najwyższą prevalencję CoV sięgającą 3,51% i 5,59% stwierdzono u przedstawicieli *Anseriformes* i *Charadriiformes* będących głównym rezerwuarem CoV.

Dokonując oceny występowania CoV w populacji dzikich ptaków w Polsce podjęto również próbę oszacowania zależności zmian poziomu zakażeń CoV od pory roku. Ocenę tą przeprowadzono dla dwóch najliczniej reprezentatywnych w badaniach gatunków tj. kaczki krzyżówki, łabędzi niemych oraz mew potraktowanych jako podrodzina. Istotne różnice w występowaniu CoV stwierdzono u kaczek krzyżówek i mew w miarę zmieniających się pór roku, u których najwyższy odsetek zakażeń CoV odnotowano w okresie późnego lata/wczesnej jesieni, a następnie w okresie zimowym. Wynika to z większej wrażliwości na zakażenia młodych osobników. Dużą rolę odgrywa także skupianie się ptaków w duże grupy, zwłaszcza w okresie sezonowych migracji, co sprzyja transmisji patogenów między osobnikami.

Wśród wykrytych CoV zidentyfikowano zarówno gamma- jak i deltakoronawirusy, które różniły się od siebie częstością występowania, zakresem i specyficznością gatunkową gospodarza.

Najczęściej identyfikowano gammaCoV z przewalencją na poziomie 3,5% w porównaniu do deltaCoVs, których przewalencja wynosiła 0,65%. GammaCoV wykrywano najczęściej u ptaków blaszkodziobych, u których stanowiły 100% wszystkich CoV. W obrębie *Anseriformes* gammaCoV najczęściej identyfikowano u kaczek krzyżówek (4%) oraz u łabędzi niemych (2%). Oprócz blaszkodziobych gammaCoV identyfikowano licznie u siewkowych (3,14%) oraz u gołębi miejskich (47,4%) z *Columbiformes*. Pojedyncze zakażenia stwierdzano również u przedstawicieli rzędów *Gruiformes*, *Galliformes* oraz *Passeriformes* co wskazuje na szeroki zakres gospodarzy gammaCoV. Deltakoronawirusy najliczniej wykrywano u mew (*Charadriiformes*) oraz u pojedynczych przedstawicieli dwóch kolejnych rzędów *Galliformes* oraz *Suliformes*, co może wskazywać na węższy zakres gospodarzy niż w przypadku gammaCoV. Przeprowadzone badania ponadto wykazały, iż zarówno mewy jak również bażanty mogą być gospodarzem dla gamma- jak i deltaCoVs.

Na podstawie przeprowadzonej analizy filogenetycznej 71 wykrytych szczepów: 46 gammaCoV i 25 deltaCoVs w oparciu o fragment genu RdRp wykazano, że gammaCoV należą do podrodzaju *Igacovirus* oraz *Brangacovirus*. Wykryte szczepy w obrębie podrodzaju *Igacovirus* utworzyły 3 grupy filogenetyczne. Najliczniejszą grupę stanowiły igakowirusy tworzące wspólną gałąź drzewa filogenetycznego razem z przedstawicielem gatunku DuCoV2714. Grupa ta obejmowała igakowirusy pochodzące od ptaków blaszkodziobych i siewkowych układające się w dwie podgrupy. Jednakże podgrupy to nie były jednorodne co wskazuje, iż niektóre igakowirusy choć wykazują specyficzność gatunkową to jednak mogą też przenosić się pomiędzy różnymi gatunkami ptaków. W obrębie drugiej grupy znalazły się dwa igakowirusy pochodzące od gęsi gęgawy oraz bażanta zwyczajnego i tworzyły one wspólną gałąź filogenetyczną z gatunkami AvCoV/AvCoV9203 czyli od lat znanymi patogenami drobiu (IBV, TCoV). Uzyskane wyniki potwierdzają, iż ptaki dzikie mogą być rezerwuarem szczepów CoV homologicznych do IBV, chociaż w Polsce zjawisko to jest raczej okazjonalne. Trzecią odrębną grupę tzw. „pigeon-like” utworzyły szczepy zidentyfikowane u gołębi (*Columbiformes*) i szpaka (*Passeriformes*).

Analiza filogenetyczna deltaCoV wykazała przynależność większości szczepów do podrodzaju *Buldecovirus* a tylko jeden szczep pochodzący od kormorana należał do podrodzaju *Herdecovirus*. Największy odsetek buldekowirusów (ponad 88%) zidentyfikowano u mew i tworzyły one odrębną grupę filogenetyczną. Przeprowadzone badania wskazują potrzebę ustalenia takiego gatunku i właściwa wydaje się rekomendacja na to miejsce szczepu Black-headed gull dCoV/Poland/P350/2017 (Gull CoV PL350), dla którego w niniejszych badaniach uzyskano pełną sekwencję. Kolejną odrębną grupę buldekowirusów, nie reprezentowaną przez oficjalny gatunek tworzył szczep pochodzący od bekasa kszyka z rodziny *Scolopacidae*. Zaledwie jeden buldekowirus zidentyfikowany u bażanta zwyczajnego z rodziny *Galliformes* uplasował się w grupie skupiającej gatunek ratyfikowany przez ICTV - koronawirus świń HKU15. Ponadto wykryty w niniejszych badaniach deltaCoV u bażanta jest pierwszym takim przypadkiem na świecie.

Kolejnym celem pracy było uzyskanie pełnych sekwencji genomowych wybranych CoV

z wykorzystaniem NGS. W podjętych próbach uzyskano cztery pełne sekwencje deltakoronawirusów oraz jedną częściową sekwencję gammakoronawirusa. Wszystkie pochodziły od ptaków rodziny *Laridae*. Uzyskane sekwencje CoV są pierwszymi od dzikich ptaków z terytorium Europy/Polski oraz pierwszymi scharakteryzowanymi wirusami wykrytymi u mew.

W badaniach podjęto również badania serologiczne, a obecność przeciwciał świadczących o kontakcie ptaków dzikich z wirusami IB-podobnymi oznaczono zestawem komercyjnym. ELISA. Wysoki odsetek dodatnich surowic (64%) uzyskano w przypadku bocianów białych, natomiast zaledwie 4 (4,6%) w przypadku kaczek krzyżówek.

Summary

Coronaviruses, as a diverse group of pathogens, constitute a serious health problem for numerous species of birds and mammals, including humans. These pathogens are characterized by a high degree of variability and a relatively high potential of breaking interspecies barriers, as exemplified by the appearance of the pandemic SARS-CoV-2 in 2019. In the representatives of the Aves, coronaviruses are primarily pathogens of poultry, which threaten their health and production, especially in intensive farming, causing enormous economic losses. Importantly, recent studies have been shown a much greater diversity of coronaviruses, which occur in many species of free-living birds as asymptomatic infections. Considering the large diversity of bird species and their migration abilities, it is believed that they can act not only as a gamma and deltaCoVs reservoir, but also as a vector in the spread of coronaviruses over long distances. In addition, due to the close existence and contact of wild birds with poultry, gene exchange may take place, which could influence the formation of new CoVs variants.

The main aim of this study was to assess the occurrence of gamma- and deltacoronaviruses in the population of wild birds in territory of Poland and their molecular characteristics. In the first stage, the pancoronavirus RT-nested PCR method was adopted, which enable the amplification of 554 nt polymerase gene fragment corresponding to the nsp12-RdRp domain. The applied method made it possible to detect genetic material of CoV in 166 samples out of 3998 tested (4.15%). Among the 81 tested bird species, belonging to 12 orders, the CoV presence was found in 16 species Anseriformes, Charadriiformes, Passeriformes, Columbiformes, Pelaeconiformes, Ciconiformes, and Psittaciformes. The conducted studies revealed the CoV presence in species, previously not mentioned as CoV-positive, i.e. bean goose, common gull, common snipe, common tern, Eurasian coot and common starling. In turn, the highest CoV prevalence, reaching 3.51% and 5.59%, was found in representatives of Anseriformes and Charadriiformes, which are the main reservoir of CoV.

We also try to assess the occurrence of CoV in the population of wild birds in Poland In following seasons of the year. This assessment was carried out for two the most numerous studied bird species, i.e. mallards, mute swans but also for gulls treated as bird subfamily. Significant differences in the occurrence of CoV were found in mallards and gulls, with the highest rates of CoV infections recorded in late summer/early fall and then in winter. This is due to higher sensitivity to infections in juveniles. The grouping of birds also plays an important role, especially during seasonal migrations, which favors the transmission of pathogens between individuals.

Among detected CoVs, both gamma- and deltacoronaviruses were identified, however thjeuir occurrence differed depending on frequency and specificity of the host. GammaCoV was the most frequently identified with a prevalence of 3.5% compared to deltaCoVs with a prevalence of 0.65%. GammaCoVs were detected mostly in *Anseriformes*, in mallards (4%) and mute swans (2%). Apart from *Anseriformes* gammaCoVs were also identified in *Charadriiformes* (3.14%) and in *Columbiformes*

(47.4%). Single CoV infections were also found in representatives of *Gruiformes*, *Galliformes* and *Passeriformes*, indicating a wide range of hosts for gammaCoV. Deltacoronaviruses were most frequently detected in gulls (*Charadriiformes*) and in single representatives of two consecutive orders *Galliformes* and *Suliformes*, which may indicate a narrower host range than in the case of gammaCoV. The conducted studies also showed that both gulls and pheasants (*Phasianus colchicus*) can be hosts for gamma- and deltaCoVs.

Phylogenetic analysis of 71 detected CoV strains: 46 gamma- and 25 deltaCoVs shows that gammaCoV belong to the *Igacovirus* and *Brangacovirus* subgenus. The detected strains within the *Igacovirus* subgenus formed 3 phylogenetic groups. The most numerous group were igacoviruses forming a common branch of the phylogenetic tree with the DuCoV2714 species. This group consisted of igacoviruses originating from *Anseriformes* and *Charadriiformes*, arranged into two subgroups. However, these subgroups were not homogeneous, which indicates that some igacoviruses, could also spread between different bird species. The second group included two igacoviruses from the greylag goose and common pheasant, and they were within common phylogenetic branch with AvCoV/AvCoV9203 species (poultry pathogens IBV, TCoV). The obtained results confirm that wild birds can be a reservoir of CoV strains homologous to IBV, although in Poland this phenomenon is rather occasional. The third separate group called as the “pigeon-like” was formed by the strains identified in pigeons (*Columbiformes*) and starling (*Passeriformes*).

In turn, phylogenetic analysis of deltaCoV revealed that most of them belongs to the *Buldecovirus* subgenus and only one strain identified in cormorant belongs to the *Herdecovirus* subgenus. Over 88% of buldecoviruses were identified in gulls and they formed a separate phylogenetic group. Our studies indicate the need to establish new deltaCoV species and it seems appropriate to recommend the Black-headed gull strain dCoV/Poland/P350/2017 (Gull CoV PL350) as representative, for which the full sequence was obtained in this study. Another separate group of buldecoviruses, not represented by the official species, forms the strain identifiers in common snipe (*Scolopacidae*). Only one buldecovirus identified in the common pheasant (*Galliformes*) was within the group occupied by the species ratified by ICTV - swine coronavirus HKU15. Moreover, deltaCoV detected in this study in pheasant is the first such case in the world.

Another goal of the study was to obtain complete genome of selected CoVs using NGS. Four complete sequences of deltacoronaviruses and one partial sequence of gammacoronavirus were obtained. All sequenced strains were detected in gulls. The obtained CoV sequences are the first sequenced in Europe/Poland and the first detected in gulls.

Serological tests using commercial ELISA kit revealed the presence of antibodies against IB-like viruses in sera of white storks (64% of positives) but also of mallards (4.6%).