

Charakterystyka szczepu reowirusa wyizolowanego z przypadku reowirozy brojlerów

HANNA CZEKAJ, ELŻBIETA SAMOREK-SALAMONOWICZ, WOJCIECH KOZDRUŃ

Pracownia Diagnostyki Chorób Wirusowych Drobiu Państwowego Instytutu Weterynaryjnego, al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Czekaj H., Samorek-Salamonowicz E., Kozdruń W.

Characteristics of reovirus strain isolated from a case of reovirus in broilers

Summary

Investigations were carried out on chickens coming from parent flocks vaccinated against reoviruses. Beginning from the seventh day of life, difficulties in moving, leg paralysis, decreased appetite and sporadic diarrhoea were observed in these chickens. On post-mortem examination the liver and spleen were very enlarged with a hard consistency and small white necrotic foci were visible. Serological examinations for reovirus presence were performed 3 times and showed positive seroconversion. The death rate reached 38.4%, mean body weight was 2.08 kg after 47 days of age and feed consumption was 2.4 kg per kg of body weight. Reovirus strain was isolated from the spleen and liver of these broilers. The strain was identified as avian reovirus on the basis of cytopathic effects in chick embryo fibroblast culture and by using polyclonal serum against reoviruses. This identification was confirmed by the RT-PCR method. Infecting one-day-old chicks, through the beak, with a suspension prepared from the liver and spleen, resulted in decreased body weight gains by 30.4% in comparison with the control chicks. The mortality rate was 66.7%. Post-mortem lesions in dead chicks were the same as those found in birds in the farm.

Keywords: chickens, reovirus, antibodies, antigen, RT-PCR, biological test

Od kilku lat notowane są przypadki reowirozy w stadach brojlerów na terenie całego kraju. Choroba występuje w pierwszych dwóch tygodniach życia zarówno u kurcząt pochodzących ze stad szczepionych przeciwko zakażeniom reowirusowym szczepionkami klasycznymi, jak też nie szczepionych (7, 8). Choroba ma ostry przebieg, śmiertelność wynosi nawet do 50% ptaków w stadzie (7). Zakażenie szerzy się drogą pionową poprzez jaja wylęgowe, a wyklute pisklęta stają się źródłem zakażenia dla piskląt w komorze kłujnikowej i w fermie (6, 7). U ozdrowieńców występuje znaczne zróżnicowanie we wzroście, będące przyczyną wybrakowań w ubojniach i zwiększenia strat ekonomicznych. Czynnikiem etiologicznym tej choroby są reowirusy ptasie określane jako szczepy ERS (Enteric Reoviruses Strains) wyizolowane w 1998 r. przez Mintę i wsp. (7).

Przeprowadzone badania miały na celu scharakteryzowanie szczepu reowirusa wywołującego u kurcząt brojlerów pochodzących od rodziców szczepionych przeciwko reowirusom ostrą formę reowirozy.

Materiał i metody

Ptaki. Badania przeprowadzono w brojlerach pochodzących z fermy X. Dodatkowo użyto 20 jednodniowych piskląt SPF (Lohmann) leżonych w tutejszej Pracowni.

Wykrywanie przeciwciał przeciwko reowirusom. Badania serologiczne wykonywano testem ELISA przy użyciu zestawu komercyjnego firmy IDEXX, wyniki analizowano przy użyciu programu komputerowego xChek. Każdorazowo badano po 23 próbki surowic, które pobierano od ptaków trzykrotnie w wieku 11, 21 i 47 dni życia.

Izolacja czynnika wirusowego. Wycinki wątroby i śledziony pobrane od 13-dniowych chorych kurcząt homogenizowano i uzyskanymi, wg ogólnie przyjętych zasad, supernatantami inokulowano zarodki kurcze SPF do worka żółtkowego w 5-6 dniu inkubacji, stosując po 0,2 ml/zarodek. Zakażone zarodki inkubowano przez 7 dni codziennie prześwietlając. Wszystkie zarodki zmarłe i schłodzone po okresie obserwacji poddawano badaniu embriopatologicznemu, pobierano płyny i błony zarodkowe.

Namnażanie izolatów wirusowych. Jednolitą warstwę komórek fibroblastów zarodka kurzego (CEF), sporządzaną z 11-dniowych zarodków kurzych SPF wg ogólnie przyjętych zasad (5), zakażano materiałami wirusowymi uzyskanymi z zarodków kurzych. Po stwierdzeniu mikroskopowo efektu cytopatycznego, najczęściej po 48-72 h p.i. hodowle trzykrotnie zamrażano i rozmrażano i po stwierdzeniu jałowości używano do dalszych badań.

Wykrywanie antygenu wirusowego. Materiały wirusowe uzyskane z pasażu w zarodkach kurzych badano odczynem immunodiffuzji w żelu agarowym (AGP) wobec poliklonalnej surowicy odpornościowej przeciwko szczepowi standardowemu S1133 reowirusa kurzego. Odczyn przeprowadzano mikrometodą w 1,5% żelu wg ogólnie przyjętych zasad (11). Wyniki odczytywano po 24-48 h inkubacji w komorze wilgotnej w temperaturze pokojowej. Obecność prążka precypitacyjnego pomiędzy surowicą a badanymi materiałami świadczyła o obecności antygenu wirusowego.

Reakcja RT-PCR. Kwas rybonukleinowy izolowano z materiałów wirusowych namnożonych w hodowli CEF przy użyciu komercyjnego zestawu produkcji firmy QIAGEN. Do oceny swoistości reakcji zastosowano inny wirus RNA – wirus choroby Gumboro (IBDV), kontrolę ujemną st-

nowiły komórki CEF nie zakażone. Stosowano startery charakterystyczne dla fragmentu S1 genomu szczepu S1133 reowirusa ptaków opracowane przez Xie i wsp. (10):

– REO 1 (łańcuch 24 oligonukleotydów) – 5' GGT GCG ACT GCT GTA TTT GGT AAC 3' – bezpośredni,

– REO 2 (łańcuch 21 oligonukleotydów) – 5' AAT GGA ACG ATA GCG TGT GGG 3' – odwrotny. Startery otrzymano z firmy DNA Gdańsk.

Przy użyciu komercyjnego zestawu produkcji firmy MBI Fermentas przeprowadzono reakcję odwrotnej transkrypcji RNA. Uzyskane łańcuchy cDNA amplifikowano w termocyklerze firmy Biometra. Stosowano 35 cykli przy następujących parametrach termicznych: 94°C – 1 min.; 57°C – 1 min.; 72°C – 1 min. Końcowe wydłużenie łańcuchów cDNA wykonywano w temp. 72°C przez 10 min. Produkty amplifikacji poddawano rozdzielaniu elektroforetycznemu w 1,0% żelu agarozowym w czasie 40–60 min. przy napięciu 100V, a następnie barwiono roztworem bromku etydyny (0,5 mg/ml) i analizowano w świetle UV.

Próba biologiczna. 20 jednodniowych piskląt SPF podzielono na 2 grupy. 15 pisklątom podano dodziobowo po 0,2 ml filtratów z wątroby i śledziony chorych ptaków, a 5 piskląt otrzymało w taki sam sposób płyn PBS i stanowiły one grupę kontrolną. Ptaki odchowywano w oddzielnych, izolowanych pomieszczeniach i obserwowano przez 4 tygodnie. W czasie trwania doświadczenia prowadzono obserwacje kliniczne. Wszystkie ptaki padłe badano anatomopatologicznie. Po zakończeniu doświadczenia ptaki, które przeżyły ważono, poddawano ubojowi i przeprowadzano badanie sekcyjne.

Wyniki i omówienie

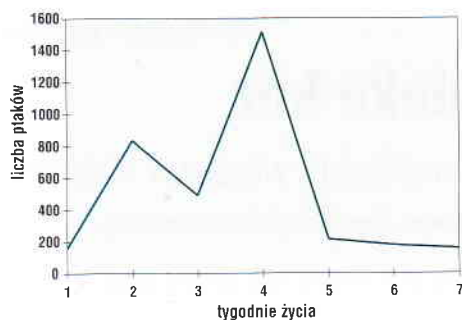
Opis przypadku. Fermę X, w której wcześniej nie występowały zakażenia reowirusami, zasiedlono 17 000 piskląt rasy Coob-500 pochodzących od rodziców szczepionych przeciwko reowirusom dwukrotnie szczepionką żywą zawierającą szczep S1133 i dwukrotnie szczepionką inaktywowaną opartą na szczepach 1733 i 2408, zgodnie z zalecanym programem profilaktycznym. Pisklęta początkowo odchowywały się prawidłowo, nie notowano objawów chorobowych ani zwiększonych padnięć. Od 7 dnia życia obserwowano trudności w poruszaniu się, porażenia kończyn, zmniejszenie apetytu, u pojedynczych ptaków wystąpiła biegunka oraz zwiększająca się śmiertelność. U ptaków padłych wątroba i śledziona były znacznie powiększone z niewielkimi białymi ogniskami martwicy, sporadycznie stwierdzano nieżyty stan zapalny jelit cienkich. Śmiertelność wzrastała w kolejnych tygodniach odchowu (ryc. 1). W drugim tygodniu padło 830 kurcząt (4,9%), a w 4 tygodniu aż 1514 sztuk (8,9%). Od 5 tygodnia życia śmiertelność malała. Łącznie w czasie cyklu odchowu padło 20,9% brojlerów. Kurczęta, które przechorowały wykazywały znaczne zróżnicowanie we wzroście. W ubojni wybrakowano dodatkowo 2646 kurcząt (15,56%). Wskaźniki produkcyjne cyklu odchowu były znacznie obniżone, po 47 dniach średnia masa ciała ptaków wynosiła 2,08 kg. Natomiast zużycie paszy na 1 kg masy ciała 2,4 kg. Dotychczas opisywane przypadki reowirusy kurcząt brojlerów miały przebieg analogiczny, śmiertelność była najbardziej nasiloną w ostrej fazie choroby (2-3 tydzień

życia). We wszystkich przypadkach notowano znaczne zróżnicowanie we wzroście powiększające straty ekonomiczne odchowu (7, 8).

Przebieg choroby i obserwowane w narządach wewnętrznych ptaków zmiany sekcyjne wskazywały na zakażenie patogennym szczepem reowirusa (ERS). W tabeli 1 przedstawiono wyniki badań serologicznych. W 11 dniu życia przeciwciała przeciwko reowirusom stwierdzono w teście ELISA w 39,1% próbek. Średnia mian wynosiła 865, a zakres mian od 1 do 7957, wartość współczynnika zmienności 188,3%. Znaczne zróżnicowanie mian ELISA i wysoka wartość współczynnika zmienności wskazywały na zakażenie reowirusami. Badanie przeprowadzone w 10 dni później wykazało obecność przeciwciał we wszystkich badanych próbkach. Wartość średniej mian badanych surowic była dwukrotnie wyższa niż w pierwszym badaniu, a współczynnik zmienności wynosił 47,9%. W próbkach surowic kurcząt pobranych w 47 dniu życia, podczas uboju, stwierdzono dalszy wzrost poziomu przeciwciał w surowicy ptaków – średnia mian wynosiła 5164 i stwierdzano je we wszystkich próbkach.

W kolejnym etapie badań przeprowadzono izolację czynnika wirusowego w zarodkach SPF oraz jego identyfikację. Zakażone zarodki zamierały w pierwszym pasażu pomiędzy 48 a 96 h p.i. Stwierdzano pogrubienie i przekrwienie błon zarodkowych, a także obrzęki i przekrwienia w okolicy grzbietu zarodków. W homogenatach błon zarodkowych, w odczynie AGP wobec surowicy anti-reo obserwowano wystąpienie prążków precipitacyjnych świadczących o obecności grupowo-swoistego antygeny reowirusów ptasich. Po zakażeniu komórek fibroblastów zarodka kurzego od pierwszego pasażu notowano występowanie efektu cytopatycznego charakterystycznego dla reowirusów.

Celem dalszej identyfikacji izolatu wirusowego zastosowano metodę RT-PCR. Elektroforezę produktów reakcji przeprowadzoną w żelu agarozowym przedstawiono na ryc. 2. Produkty amplifikacji o wielkości 532 pz uzyskano zarówno w próbie przygotowanej ze standardowego szczepu S1133 jak również w próbach z izolatów pochodzących z wątroby i śledziony chorych ptaków. W próbach kontrolnych pochodzących ze szczepu IBDV oraz z komórek CEF nie zakażonych nie obserwowano obecności produktu reakcji. Do amplifikacji fragmentu genu S1 charakterystycznego dla standardowego szczepu S1133 reowirusa ptasiego zastosowano parę starterów o sekwencji podanej przez Xie i wsp. (10). Autorzy (10) poddali analizie 6 referencyjnych i 23 terenowe szczepy reowirusów ptasich. We wszystkich próbach stwierdzili obecność produktu o wielkości 532 pz, natomiast w próbach pochodzących z innych szczepów wirusowych oraz z bakterii nie stwierdzali oni produktu amplifikacji, potwierdzając w ten sposób specyficzność tej reakcji dla reowirusów ptasich. Również Liu i Giamborne (4) poddając amplifikacji fragment segmentu S1 genomu reowirusów przy użyciu tych starterów uzyskali produkt o wielkości 532 pz. W piśmiennictwie krajowym brak jest dotychczas opracowań dotyczących zastosowania RT-PCR do wykrywania materiału genetycznego reowirusów ptasich.



Ryc. 1. Padnięcia i wybrakowania kurcząt w okresie odchowu



Ryc. 3. Zmiany sekcyjne w wątrobie ptaka padłego w 7 dni p. i.



Ryc. 4. Zmiany sekcyjne w śledzionie kurcząt padłych w 7 dni p. i.

Ryc. 2. Rozdział produktów RT-PCR w 2% żelu agarozowym



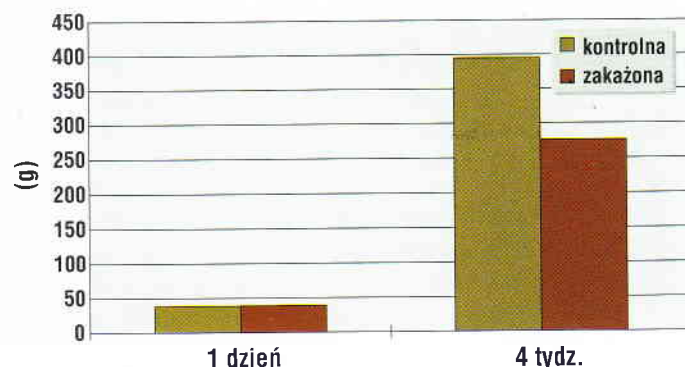
Objaśnienia: 1 i 15 – wzorzec masowy DNA (1031-80 pz), 2 i 9 – szczep S1133, 3 i 10 – supernatant z komórek CEF zakażonych rozcierem z wątroby, 4 i 14 – supernatant z komórek CEF zakażonych rozcierami ze śledziony, 5 i 12 – supernatant z komórek CEF nie zakażonych (K-), 6, 7 i 13 – szczep IBDV.

Ze względu na znaczne zróżnicowanie patogenności reowirusów występujących u kurcząt (1-3, 9), przeprowadzono próbę biologiczną. Zakażenie jednodniowych piskląt SPF homogenatami z wątroby i śledziony chorych ptaków było przyczyną występowania od 5 dnia p.i. objawów klinicznych. U kurcząt widoczne było osowienie, trudności w poruszaniu się, zmniejszenie apetytu i biegunka. Pomiedzy 6 a 10 dniem p.i. padło 8 ptaków i w 14 dni p.i. 2 ptaki. Zmiany sekcyjne, podobnie jak u kurcząt w fermie występowały w wątrobie i śledzionie. Narządy te były powiększone z ogniskami martwicy (ryc. 3 i 4). Wątroby były blade o konsystencji kruchej, natomiast śledziona twarda blade lub znacznie przekrwiona. U 2 ptaków stwierdzono również atrofie torby Fabrycjusza. Pozostałe przy życiu ptaki były znacznie zahamowane we wzroście. Na ryc. 5 przedstawiono średnie masy ciała ptaków. W cztery tygodnie po zakażeniu średnia masa ciała kurcząt z grupy zakażonej była niższa o 119,3 g (30,4%) w porównaniu do średniej masy ciała kurcząt z grupy kontrolnej i różnica ta była statystycznie istotna. U ptaków w grupie kontrolnej w czasie trwania doświadczenia nie obserwowano objawów klinicznych ani śmiertelności. Wyniki zakażenia kontrolnego piskląt SPF wykazały, że pochodzący od kurcząt brojlerów szczep reowirusa ptasiego był szczepem wysoce patogennym.

Reasumując należy stwierdzić, że szczep wirusowy wyizolowany od kurcząt brojlerów, pochodzących od rodziców szczepionych przeciwko reowirusom, cechował się znaczną patogennością dla zarodków kurzych

Tab. 1. Wyniki badań serologicznych surowic kurcząt w kierunku reowirusów test ELISA (IDEXX)

Wiek ptaków (dni)	Liczba prób badanych	Średnia mian	Zakres mian	Współczynnik zmienności	Odsetek prób dodatnich
11	23	865	1-7957	188,3%	39,1
21	23	1698	510-8346	47,9%	100
47	23	5164	453-15 001	-	100



Ryc. 5. Średnia masa ciała kurcząt zakażonych homogenizatami narządów wewnętrznych

i piskląt oraz wykazywał cechy charakterystyczne dla reowirusów ptasich szczepów ERS.

Piśmiennictwo

- Czekaj H., Samorek-Salamonowicz E., Kozdrun W., Kozaczyński W.: Patogenność szczepów reowirusów izolowanych w kraju. Zesz. Nauk. AR Wrocław 2000, 376, 105-114.
- Goodwin M. A., Davis J. F., Craig Player E.: Reovirus-associated enteritis in Georgia broiler chicks. Avian Dis. 1993, 37, 229-235.
- Jones R. C.: Avian reovirus infections. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 2000, 19, 614-625.
- Liu H. J., Giamborne J. J.: Amplification, cloning and sequencing of the C-encoded gene of avian reovirus. J. Virol. Meth. 1997, 63, 203-208.
- Mayr A., Bachmann P. A., Bibrack B., Wittmann G.: Virusologische Arbeitmethoden, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena 1977.
- McNulty M. S.: Virus infections of birds. Wyd. J. B. McFerran and M. S. McNulty. Elsevier Science Publishers B. V. 1993, s. 181.
- Minta Z., Bugajak P., Daniel A., Mazurkiewicz M., Wieliczko A., Gaweł A., Batczak R., Kozaczyński W., Wiciński J.: Przypadki reowirusy u kurcząt brojlerów w Polsce. Mat. Konf. Nauk. Rola reowirusów w patologii ptaków. Wrocław 1998, s. 35.
- Minta Z.: Reowirusy w zblizeniu. Magazyn Wet. 1999, supl., 6-9.
- Tang K. N., Fletcher O. J., Villegas P.: Comparative study of the pathogenicity of avian reoviruses. Avian Dis. 1987, 31, 577-583.
- Xie Z., Fadl A. A., Girshick T., Khan M. I.: Amplification of avian reovirus RNA using the reverse transcriptase – polymerase chain reaction. Avian Dis. 1997, 41, 654-660.
- Yates V. J., Rhee Y. O., Fry D. E., El-Mishad A. M., Milomick K. J.: The presence of avian adenoviruses and adeno-associated virus in health chickens. Avian Dis. 1976, 20, 146-151.

Adres autora: dr Hanna Czekaj, ul. Norwida 3/17, 24-100 Puławy; e-mail: hczekaj@piwet.pulawy.pl