

Analiza filogenetyczna szczepów wirusa choroby Derzsyego izolowanych od gęsi w Polsce

WOJCIECH KOZDRUŃ, TAMAS MATO*, VILMOS PALYA*,
ELŻBIETA SAMOREK-SALAMONOWICZ, KATARZYNA KRÓL,
GRZEGORZ WOŹNIAKOWSKI

Zakład Chorób Wirusowych Drobiu Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego,
Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

*CEVA – Phylaxia Veterinary Biologicals Co. Ltd, Szallas utca 5, H – 1107 Budapest, Hungary

Kozdruń W., Mato T., Palya V., Samorek-Salamonowicz E., Król K., Woźniakowski G.
Phylogenetic analysis of Derzsy's disease virus isolated from geese in Poland

Summary

Derzsy's disease occurring in geese is caused by a virus from the Parvoviridae family called the Derzsy's disease virus or goose parvovirus. For thirty years Derzsy's disease has been observed in Poland and currently it is the cause of large economic losses. The main objective of the study was come up with the molecular characteristics of Derzsy's disease virus strains isolated from field cases. The samples were taken from 65 goose flocks. The geese, 1.5-6-weeks-of-age, were suspected of being affected with Derzsy's disease. Seven viral isolates were isolated from visceral organs of the geese and on the basis of cytopathic changes in goose embryo fibroblasts culture and pathological changes in goose embryos were classified as Derzsy's disease virus strains. One band of 806 bp size, which is characteristic of Derzsy's disease virus, was demonstrated in PCR. On the basis of phylogenetic analysis, the strains were classified as goose parvovirus. The strains were qualified to two phylogenetic groups: vaccine and low pathogenicity strains and field strains. The calculated similarity between the studied strains ranged from 92.3% to 100% and between European strains from 91.3% to 99.5%. On the basis of the authors' research it can be claimed that Polish Derzsy's disease strains differ slightly from each other but all of the strains have a common European origin.

Keywords: Derzsy's disease virus, PCR, phylogenetic analysis

Choroba Derzsyego występująca u gęsi i kaczek piżmowych jest jednym z najpoważniejszych problemów, które pojawiły się w intensywnej hodowli drobiu wodnego.

Czynnikiem etiologicznym tej choroby jest wirus z rodzaju *Dependovirus*, należący do rodziny *Parvoviridae*, zwany wirusem choroby Derzsyego (DDV) lub parwowirusem gęsim (GPV). Jest to wirus bezotoczkowy o symetrii dwudziestościennej, posiadający wirion o średnicy 20-22 nm, składający się z 32 kapsomerów. Genom zbudowany jest z jednoniciowego DNA o wielkości 5106 bp. Zawiera dwie główne ramki odczytu (ORFs), jedną dla białek nukleokapsydu, drugą dla białek regulatorowych. Ramki te są ograniczone przez odwrócone końcowe powtórzenia (ITRs – inverted terminal repeat). Zidentyfikowano 4 główne białka wirusowe o masach cząsteczkowych: 91, 78, 60 i 58 kDa (3, 4, 7-9, 12).

Nie stwierdzono powinowactwa antygenowego parwowirusa gęsiego z innymi parwowirusami ptaków i ssaków, natomiast szczepy parwowirusów izolowane od gęsi w różnych krajach są identyczne lub bardzo zbliżone. Występują różnice pomiędzy szczepami izo-

lowanymi od gęsi i kaczek piżmowych, co zostało potwierdzone za pomocą odczynu seroneutralizacji krzyżowej i analizy restrykcyjnej. Genom parwowirusa gęsiego jest o 26 bp krótszy niż genom parwowirusa kaczki piżmowej (7, 8, 10, 16).

W Polsce, na początku lat sześćdziesiątych Wachnik i wsp. (15) opisali przypadki wirusowego zapalenia wątroby u gąsiąt, później zdiagnozowane jako choroba Derzsyego. W latach siedemdziesiątych występowanie choroby Derzsyego nasiliło się i corocznie notowano przypadki masowych padnięć młodych gąsiąt (5, 6). W 1982 r. wprowadzono systematyczne szczepienia profilaktyczne gęsi stad reprodukcyjnych. Szczepienia te znacznie ograniczyły występowanie choroby. Jednakże w latach dziewięćdziesiątych zanotowano ponownie przypadki choroby Derzsyego. Choroba wprawdzie przebiega z niższą śmiertelnością niż w poprzednim okresie, ale nadal jest przyczyną znacznych strat ekonomicznych w dotkniętych stadach (1).

Celem badań była charakterystyka molekularna szczepów wirusa choroby Derzsyego izolowanych z przypadków terenowych w ciągu ostatnich dziesięciu lat.

Materiał i metody

Gęsi. Materiał do badań pochodził z 65 stad gęsi w wieku 1,5-6 tyg. zlokalizowanych na terenie całej Polski, w których podejrzewano występowanie choroby Derzsyego. Liczebność ptaków w stadzie wynosiła od 250 do 8000 ptaków, odsetek padnięć od 12 do 76. Do badań dostarczano od 3 do 11 ptaków ze stada. W trakcie badania anatomopatologicznego pobierano krew do badań serologicznych oraz wycinki narządów wewnętrznych.

Test ELISA. Wykonywano go w 96-baseniowych mikroplątkach opłaszczonych antygenem DDV produkcji własnej. Surowice badane oraz kontrolne rozcieńczano 1/100. Stosowano koniugat produkcji własnej, który stanowiła immunoglobulina królika przeciwko IgG gęsi znakowana peroksydazą chrzanową, a substrat stanowił ABTS. Wyniki reakcji barwnej odczytywano w spektrofotometrze przy długości fali 405 nm. Próbkę uznawano za dodatnie o wartości gęstości optycznej (OD) powyżej 0,200, za wątpliwe o wartości $0,200 > OD > 0,150$, natomiast w próbkach ujemnych OD wynosiło poniżej 0,150 (11).

Przygotowanie materiałów do izolacji wirusa. Pobrane od ptaków z tej samej fermy wycinki wątrób i wycinki z mięśnia sercowego umieszczano w oddzielnych płytkach Petriego. W ten sposób z każdej fermy uzyskiwano po 2 materiały do dalszych badań. Następnie pobrany materiał poddawano homogenizacji i zawieszano w płynie PBS z dodatkiem mieszaniny antybiotyków 1 ml/100 ml (Antibiotic – Antymycotic – Gibco). Po trzykrotnym zamrożeniu i rozmrożeniu wirowano w 4°C przy 2000 obr./min. przez 20 min. Po stwierdzeniu jałowości uzyskane supernatanty przechowywano w temperaturze -20°C.

Izolacja wirusa w hodowli fibroblastów zarodka gęsiego. Hodowlę fibroblastów zarodka gęsiego sporządzano z 12-14-dniowych zarodków gęsich według ogólnie przyjętych zasad. Podłoże wzrostowe stanowił płyn Eagle'a z dodatkiem 10% surowicy cielęcej i 0,01% mieszaniny antybiotyków (Antibiotic – Antymycotic – Gibco). Zawiesinę komórek GEF o gęstości $1,0 \times 10^{4,0}$ komórek/ml zakażano bezpośrednio przy zakładaniu hodowli homogenizatem narządów wewnętrznych badanych ptaków. Kontrolę prawidłowości zakażenia komórek stanowił szczep szczepionkowy PIW-82 służący do produkcji szczepionki DERVAC (PIWet-PIB Puławy). Zakażone hodowle komórek obserwowano przez 7 dni pod mikroskopem i oceniano powstawanie efektu cytopatycznego. Po 7 dniach zbierano materiał wirusowy z zakażonych hodowli, który służył do przeprowadzenia następnego pasażu. Materiał uzyskany z trzeciego pasażu użyto do dalszych badań.

Izolacja wirusa w zarodkach. Wykonywano ją w 12-13-dniowych zarodkach gęsich. Zarodki zakażano do jamy omoczniowej po 0,2 ml homogenizatu narządów wewnętrznych ptaków. Zarodki inkubowano przez 10 dni w 37°C i wilgotności ok. 55%. W trakcie badania embriopatologicznego od zarodków zamaryłych i schłodzonych po 10 dniach inkubacji pobierano płyny i błony zarodkowe oraz wątroby, które służyły do przeprowadzenia kolejnych trzech pasażu.

Izolacja DNA. W momencie wystąpienia efektu cytopatycznego w trzecim pasażu zakażone komórki GEF zbie-

rano i izolowano całkowite, komórkowe DNA przy użyciu zestawu komercyjnego firmy Qiagen (USA). W przeprowadzonym rozdziale elektroforetycznym w 1% żelu agarozowym potwierdzono prawidłowość izolacji i czystość wyizolowanego DNA widocznego w świetle UV w postaci jednego prążka.

Reakcja amplifikacji i elektroforeza produktów PCR. Stosowano startery dla regionu VP1 genomu wirusa choroby Derzsyego, które zsyntetyzowano w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie. Sekwencja starterów była następująca: DDV 1 – 5' CCG GGT TGC AGG AGG TAC 3'; DDV 2 – AGC TAC AAC AAC CAC ATC 3' (13). Stosunek G + C w DDV 1 wynosił 66,7%, natomiast w DDV 2 44,4%. Liofilizat ze starterem DDV 1 rozpuszczano w 354 µl buforu TE do koncentracji 100 µM, natomiast DDV 2 w 282 µl buforu TE. W PCR używano koncentracji 10 µM każdego ze starterów.

Reakcję amplifikacji wykonywano w mieszaninie reakcyjnej o objętości 25 µl zawierającej: 5 µl buforu do PCR (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, Triton X-100); 2 µl mieszaniny deoksynukleotydów (0,2 mM); po 2 µl każdego ze starterów (po 10 mM); 2 µl wyizolowanego DNA, 1 µl Taq polimerazy DNA (1 u/1 µl) oraz 11 µl wody dejonizowanej.

Warunki termiczne reakcji amplifikacji były następujące: 30 cykli: denaturacja wstępna – 94°C – 30 s; przyłączenie starterów – 52°C – 30 s; wydłużanie łańcucha 72°C – 1 min.; końcowe wydłużanie łańcucha – 72°C – 10 min.

Produkty PCR analizowano po przeprowadzeniu rozdziału elektroforetycznego w 2% żelu agarozowym. Do odpowiednich baseniaków żelu nanoszono po 5 µl mieszaniny poreakcyjnej i 2 µl buforu obciążającego do prób (0,25% błękitu bromofenolowego; 40% w/v sacharozy w wodzie). Jako buforu elektrodowego używano buforu TBE (Tris – Base 10,8 g; kwas borowy 5,5 g; 4 ml 0,5 M EDTA o pH 8,0). Rozdział elektroforetyczny przeprowadzano przez 1 h przy napięciu 120 V. Po zakończonej elektroforezie barwiono żel w roztworze bromku etydyny (1 µg/ml) i oglądano w świetle UV przy długości fali 302 nm, porównując wielkość produktów PCR z wzorcem masowym DNA (DNA plazmidu pUC19). Wynik PCR uznawano za dodatni, jeżeli w świetle UV widoczny był prążek DNA o wielkości spodziewanej dla pary starterów.

Sekwencjonowanie i analiza filogenetyczna. Po zakończonej elektroforezie w 2% żelu agarozowym otrzymane produkty PCR oczyszczano przy użyciu zestawu komercyjnego firmy Qiagen (USA), a następnie poddano sekwencjonowaniu w aparacie firmy Applied Biosystem. Zastosowano identyczne startery jak w reakcji amplifikacji.

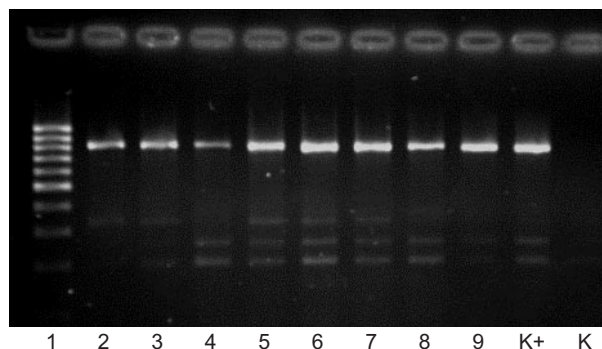
Otrzymane sekwencje produktów PCR badanych szczepów porównano z sekwencjami szczepów parwowirusów umieszczonymi w bazie danych Gene Bank. Były to sekwencje szczepów izolowanych w Polsce, Wielkiej Brytanii, na Węgrzech, we Francji, Niemczech, Danii oraz Tajwanie. Do określenia identyczności użyto sekwencji następujących szczepów: Oros/98 (HU) (Węgry); Bocsca 00/HU (Węgry); GPV/486 GB (Wielka Brytania); VG32 DE (Dania) oraz D 146/302/FR (Francja). Analizę filogenetyczną wykonano przy zastosowaniu programów komputerowych: Chromas, Blast, Clustal oraz Treeconw.

Wyniki i omówienie

Przeprowadzony test ELISA wykazał obecność przeciwciał przeciwko DDV we wszystkich badanych stadach w wieku do 5 tygodni. Miana OD wahały się od 0,150 do 0,450 w zależności od stada. Prawdopodobnie u gąsiąt pochodzących ze stad w wieku do 3 tygodni były to przeciwciała matczyne, bowiem OD było na poziomie 0,150-0,220. Jedynie w dwóch stadach gąsiąt w wieku 2,5 tygodnia i jednego w wieku 3 tygodni OD wynosiło, odpowiednio, 0,360 i 0,440. Podobnie wysokie wartości OD uzyskano w przypadku trzech stad gęsi w wieku 4 tygodni i jednego w wieku 5 tygodni.

W dalszych badaniach z narządów wewnętrznych gąsiąt pochodzących z 65 stad wyosobniono 7 izolatów wirusowych. W hodowlach GEF szczepy te powodowały powstanie efektu cytopatycznego. Obecność zmian w warstwie zakażonych komórek notowano pomiędzy 5.-7. dniem p.i. w postaci pojawiania się drobnych okrągłych komórek, silnie załamujących światło. Liczba zmienionych komórek w kolejnych dniach wzrastała, powstawały syncytia komórkowe i dochodziło do przerywania ciągłości warstwy komórek. Efekt ten był charakterystyczny dla wirusa choroby Derzsyego.

Izolaty te po wprowadzeniu do zarodków gęsi powodowały ich zamieranie po 7 dniach inkubacji. Zarodki były zahamowane w rozwoju i przekrwione, wątroby miały powiększone, przekrwione i kruche, serce powiększone i zaokrąglone. Były to zmiany typowe dla zakażeń wirusem choroby Derzsyego.

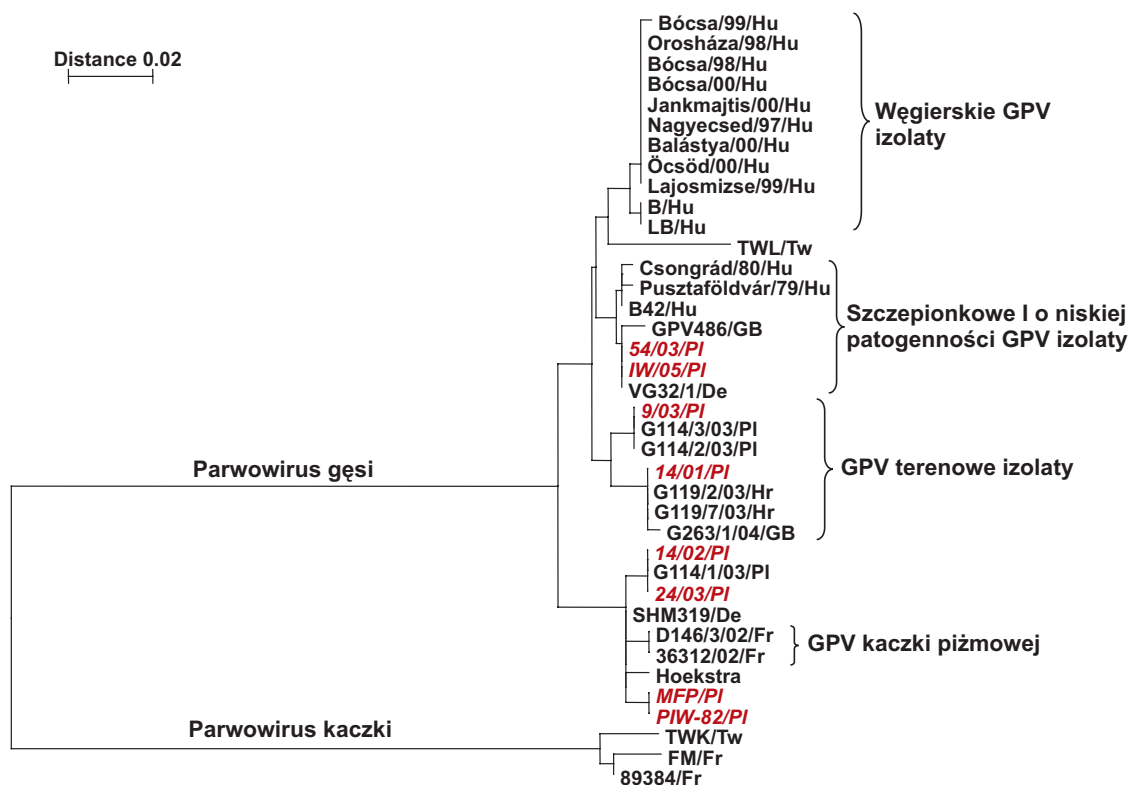


Ryc. 1.

Celem dalszej identyfikacji z namnożonych w hodowlach GEF materiałów wirusowych izolowano całkowite, komórkowe DNA i przeprowadzono reakcję amplifikacji. We wszystkich przypadkach uzyskano jeden wyraźny prążek DNA o wielkości spodziewanej dla tej pary starterów, wynoszącej 806 bp (ryc. 1), identyfikującej obecność wirusa choroby Derzsyego w badanym materiale.

Następnie określono pochodzenie i podobieństwo izolowanych szczepów. W tym celu przeprowadzono analizę filogenetyczną opartą na sekwencji nukleotydowej produktów PCR genu VP 1 wirusa choroby Derzsyego. Badane szczepy zostały zaliczone do gałęzi filogenetycznej parwowirusów gęsi. W obrębie tej gałęzi wyizolowane szczepy zakwalifikowano do 2 grup filogenetycznych. Pierwszą grupę stanowią szczepy szczepionkowe i szczepy o niskiej zjadliwości, w której znalazły się izolaty 54/03/PI i IW/05/PI. Izolaty 9/03/PI oraz 14/01/PI zaliczono do drugiej grupy szczepów terenowych (ryc. 2).

Wyniki powyższej analizy filogenetycznej zostały potwierdzone przez wyliczenie stopnia podobieństwa sekwencji nukleotydowych wyizolowanych szczepów (tab. 1). Wynosił on od 92,3% do 100%. Sekwencje nukleotydowe szczepu PIW-82 i szczepu MFP, szczepu 14/02 i 24/03 oraz szczepu 54/03 i IW/05 były identyczne, wyliczony stopień podobieństwa wynosił 100%. Natomiast sekwencja nukleotydowa szczepu 9/03 najbardziej różniła się sekwencji pozostałych



Ryc. 2.

szczepów. Wyliczony stopień podobieństwa wynosił od 92,3% do 94,2%.

Celem określenia pochodzenia badanych szczepów, ich sekwencje nukleotydowe porównano z sekwencjami szczepów węgierskich, angielskich, duńskich i francuskich. Wykazano, iż sekwencje szczepów 54/03 oraz IW/05 były identyczne z sekwencjami szczepu VG32 DE wyizolowanym w Danii, homologia pozostałych sekwencji wynosiła od 91,5% do 96,9%. Również polskie szczepy nieco różniły się od szczepów izolowanych na Węgrzech, podobieństwo sekwencji nukleotydowych między nimi wynosiło od 93,5% do 98,6%. Stwierdzono także niewielkie różnice pomiędzy szczepem izolowanym w Wielkiej Brytanii a naszymi szczepami, w tym przypadku podobieństwo sekwencji nukleotydowej wynosiło od 91,3% (szczep 9/03) do 99,5% (szczep 54/03 i IW/05).

Tatar-Kis i wsp. (14) na podstawie badań filogenetycznych podzielili szczepy wirusa choroby Derzsyego izolowane w Europie i Azji na 3 grupy filogenetyczne. Grupę 1 stanowiły węgierskie szczepy terenowe i szczepy szczepionkowe oraz szczepy o zbliżonej sekwencji do szczepów izolowanych w Wielkiej Brytanii i Niemczech. Zaliczono je ogólnie do grupy szczepów europejskich. Własne szczepy na podstawie przeprowadzonych badań, również można zaliczyć do tej grupy. Grupa 2 to szczepy wschodnioeuropejskie i szczep z Tajwanu, a grupa 3 to szczepy z Tajwanu i szczep z Tajlandii. We wszystkich tych szczepach stwierdzano identyczne sekwencje nukleotydowe lub jedynie niewielkie różnice, będące wynikiem mutacji punktowych, które miały wpływ na patogenność tych szczepów. Na podstawie sekwencjonowania stwierdzono w szczepach węgierskich mutację w pozycji 75 w postaci zamiany lizyny na asparaginę. Mutacja ta była charakterystyczna dla szczepów o niskiej patogenności i dla szczepów atenuowanych, szczepionkowych z wyjątkiem szczepu Hoekstra, pochodzącego ze szczepionki komercyjnej Palmivax (Meral – Francja), w którym w sekwencji aminokwasowej w pozycji 78 seryna została zastąpiona asparaginą (2). W badaniach własnych nie określano sekwencji aminokwasowej, która, być może, pozwoliłaby wykryć podobną mutację również w polskich szczepach.

Reasumując, na podstawie badań własnych można stwierdzić, iż polskie szczepy wirusa choroby Derzsyego różnią się nieco od siebie, lecz wszystkie mają pochodzenie europejskie.

Tab. 1. Podobieństwo sekwencji fragmentu 806 bp regionu VP1 polskich szczepów wirusa choroby Derzsyego i szczepów europejskich

| | PIW-82 | MFP | 14/01 | 14/02 | 9/03 | 24/03 | 54/03 | IW/05 |
|--------------------------|--------|------|-------|-------|------|-------|-------|-------|
| PIW-82 | x | 100 | 96,1 | 99,0 | 92,3 | 99,0 | 96,9 | 96,9 |
| MFP | 100 | x | 96,1 | 99,0 | 92,3 | 99,0 | 96,9 | 96,9 |
| 14/01 | 96,1 | 96,1 | x | 96,1 | 94,2 | 96,1 | 98,3 | 98,3 |
| 14/02 | 99,0 | 99,0 | 96,1 | x | 92,8 | 100 | 96,9 | 96,9 |
| 9/03 | 92,3 | 92,3 | 94,2 | 92,8 | x | 92,8 | 94,0 | 94,0 |
| 24/03 | 99,0 | 99,0 | 96,1 | 100 | 92,8 | x | 96,9 | 96,9 |
| 54/03 | 96,9 | 96,9 | 98,3 | 96,9 | 94,0 | 96,9 | x | 100 |
| IW/05 | 96,9 | 96,9 | 98,3 | 96,9 | 94,0 | 96,9 | 100 | x |
| Oros 98/HU ^A | 96,4 | 96,4 | 97,8 | 96,4 | 93,5 | 96,4 | 98,6 | 98,6 |
| Bocsa 00/HU ^A | 96,4 | 96,4 | 97,8 | 96,4 | 93,5 | 96,4 | 98,6 | 98,6 |
| GPV/486 GB ^B | 96,4 | 96,4 | 96,4 | 96,4 | 91,3 | 96,4 | 99,5 | 99,5 |
| VG32 DE ^C | 96,9 | 96,9 | 96,9 | 96,9 | 91,5 | 96,9 | 100 | 100 |
| D146/302/FR ^D | 99,0 | 99,0 | 99,0 | 99,0 | 89,9 | 99,0 | 96,9 | 96,9 |

Objaśnienia: A – szczep wyizolowany na Węgrzech, B – w Wielkiej Brytanii, C – w Danii, D – we Francji

Piśmiennictwo

- Budzyk J., Kempski W., Samorek-Salamonowicz E.: Przypadki choroby Derzsyego w stadach gęsi w rejonie Wielkopolski. *Życie Wet.* 1994, 69, 216.
- Chang P. C., Shien J. H., Wang M. S., Shieh H. K.: Phylogenetic analysis of parvovirus isolated in Taiwan from ducks and geese. *Avian Pathol.* 2000, 29, 45-49.
- Chu Ch. Y., Pan M. J., Cheng J. T.: Genetic variation of the nucleocapsid genes waterfowl parvovirus. *J. Vet. Med. Sci.* 2001, 63, 1165-1170.
- Derzsy D.: A viral disease of goslings. *Acta Vet. Acad. Sci.* 1967, 17, 443-448.
- Gaździński P.: Charakterystyka czynnika wirusowego wywołującego chorobę Derzsyego u gąsiąt. *Mat. III Symp. Drob. Wrocław* 1976, s. 84.
- Gaździński P., Czakala A.: Masowe upadki gąsiąt spowodowane zakażeniem wirusowym. *Biul. V Zjazdu PTNW, Olsztyn* 1974, s. 402.
- Gough R. E.: Goose parvovirus (Derzsy's disease), [w:] Swayne E., Glisson J. R., Jackwood M. W., Pearson J. E., Reed W. M.: Isolation and Identification of Avian Pathogens. American Association of Avian Pathologists, University of Pennsylvania. Kennet Square, PA 1998, 219-222.
- Gough R. E.: Goose Parvovirus Infection, [w:] Saif Y. M., Barnes H. J., Glisson J. R., Fadly A. M., McDougald L. R., Swayne D. E.: Diseases of Poultry. Iowa State Press Ames, 2003, 367-374.
- Kisary J., Derzsy D.: Characterization and classification of the causative agent of the so-called goose influenza. *Mag. Allat. Lapja* 1975, 30, 199-201.
- Kisary J., Derzsy D.: Viral disease of goslings. IV. Characterization of the causal agent in tissue culture system. *Acta Vet. Acad. Sci.* 1974, 24, 287-292.
- Samorek-Salamonowicz E., Czekaj H., Kozdruń W., Wilczyńska-Kowal M.: Wpływ immunostymulatorów na serokonwersję po szczepieniu przeciwko chorobie Derzsyego. *Medycyna Wet.* 2000, 56, 103-106.
- Schettler C. H.: Virus hepatitis of geese. II. Host range of goose hepatitis virus. *Avian Dis.* 1971, 15, 809-823.
- Sirivian P., Obayashi M., Nakamura M., Tantaswasdi U., Takehara K.: Detection of goose and Muscovy Duck Parvoviruses using polymerase chain reaction – restriction enzyme fragment length polymorphism analysis. *Avian Dis.* 1998, 42, 133-139.
- Tatar-Kis T., Mato T., Markos B., Palya V.: Phylogenetic analysis of Hungarian goose parvovirus isolates and vaccine strains. *Avian Pathol.* 2004, 33, 438-444.
- Wachnik Z., Nowacki J.: Wirusowe zapalenie wątroby u gąsiąt. *Medycyna Wet.* 1962, 18, 344-347.
- Zadori Z., Stefancsik R., Rauch T., Kisary J.: Analysis of complete nucleotide sequences of goose and Muscovy duck parvoviruses indicates common ancestral origin with adeno-associated virus 2. *Virology* 1995, 212, 562-573.

Adres autora: dr Wojciech Kozdruń, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy; e-mail: wkozdrun@piwet.pulawy.pl