

Charakterystyka molekularna krajowych szczepów cirkowirusów izolowanych od gęsi

MACIEJ KUCZKOWSKI, TOMASZ PIASECKI, ANNA WOŹNIAK, ALINA WIELICZKO

Katedra Epizootiologii z Kliniką Ptaków i Zwierząt Egzotycznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UP,
pl. Grunwaldzki 45, 50-366 Wrocław

Kuczowski M., Piasecki T., Woźniak A., Wieliczko A.

Molecular characteristics of Polish circovirus strains isolated from geese

Summary

Goose circovirus (GoCV) infections are commonly found in geese on European and Asian farms, but the role of GoCV as a causative agent of the problem in geese production has not been established yet. The aim of the study was to investigate the prevalence and molecular characteristics of circovirus infection in commercial geese farms located in South-East Poland. Tissue samples of spleen or bursa of Fabricius from 95 dead geese of different ages have been collected from 28 farms/flocks between April and September 2005. None of the clinical signs and important problems with production were reported during the time of the investigation. A polymerase chain reaction (PCR) was designed for the diagnosis of the infection. From positive samples a C1 gene fragment which encodes the capsid protein (after translation of 250 amino sizes), using two pair of primers has been amplified and a sequencing reaction was performed in both directions. The nucleotide sequences were aligned with the sequences geese circovirus strains obtained from GeneBank by BioEdit sequence alignment editor software using Clustal W multiple alignment algorithm. Prevalence of GoCV was found in 18 (18.9%) spleens or bursa of Fabricius samples from geese from 14 (35.0) flocks. All positive birds were more than 5-weeks-old. The nucleotide sequence of C1 gene fragment of Polish GoCV showed 99% to 84% identity with C1 gene sequenced by Todd et al. (accession number AJ304456 GenBank database).

Keywords: circovirus, geese, infection

Obserwowana w ostatnich latach intensyfikacja produkcji gęsi (zarówno stad reprodukcyjnych, jak i gęsi przeznaczonych do tuczu) oraz szeroki obrót materiałem hodowlanym na świecie prowadzą do wzrostu zagrożenia epidemiologicznego i w konsekwencji wybuchu chorób zakaźnych. Według Samorek-Salamonowicz i wsp. (6), przyczyną padnięć gęsi są przede wszystkim choroby bakteryjne (od 24,5% do 30,0%, w tym głównie zakażenia wywołane przez *Salmonella*, *Pasteurella*, *Mycoplasma* i *E. coli*) oraz zakażenia grzybicze (od 15,5% do 20% padnięć). Niemniej zakażenia wirusowe, w tym najgroźniejsza choroba Derzsyego (DD), która stanowi od 16,5% do 19,5% diagnozowanych przypadków, są istotną przyczyną strat w produkcji. Pomimo stosowanej od 1982 r. w kraju immunoprofilaktyki choroby Derzsyego notowany jest wzrost występowania tej choroby u gąsi pochodzących od rodziców ze stad szczepionych. Wśród czynników wpływających negatywnie na powstawanie swoistych przeciwciał poszczepiennych anty-DDV i serokonwersję wymienia się: inwazje nicieni żołądkowo-jelitowych, stres, zakażenia bakteryjne i inne zakażenia wirusowe (6, 11). W ostatnich latach w Europie pojawiają się nowe jednostki chorobowe gęsi,

wcześniej nie notowane, jak cirkowiroza (8) lub gorączka zachodniego Nilu (5).

Pierwsze doniesienia na temat zakażeń cirkowirusami gęsi (Goose circovirus – GoCV) pochodzą z 1997 r. z terenów południowej Brandenburgii w Niemczech (8). W dużej fermie gęsi (czeskie hybrydy) zaobserwowano w trakcie okresu produkcyjnego spadek masy ciała – średnio 500 g na ptaka pod koniec 9-tygodniowego okresu odchowu oraz istotny wzrost odsetka ptaków wybrakowanych. Gąsięta odchowywały się źle począwszy od pierwszego tygodnia życia, ale objawy kliniczne w stadzie ograniczyły się jedynie do zaburzenia (opóźnienia) wzrostu i opierzenia. Obserwacje prowadzone w fermie wskazywały, że etiologia przyczyn strat jest złożona, wieloczynnikowa. Nie wykluczono również udziału czynnika chorobowego o działaniu immunosupresyjnym. Szczegółowym badaniom diagnostycznym poddano gęsi 2- i 9-tygodniowe. W badaniu anatomopatologicznym stwierdzono jedynie u niektórych ptaków łagodne zmętnienie worków powietrznych. W badaniu histopatologicznym wykazano zmiany w narządach limfatycznych, w tym depłecję limfocytów w bursie Fabricjusza, śledzionie i grasicy. Stwierdzono również obecność śródcyto-

plazmatycznych, zasadochłonnych ciałek wrętowych w makrofagach grudek chłonnych bursy Fabrycjusza (praktycznie u wszystkich badanych ptaków). W mikroskopie elektronowym wykazano w bursie Fabrycjusza, grascicy, śledzionie obecność charakterystycznych, circovirus-like cząstek wirusowych. Natomiast w badaniach mikrobiologicznych wyizolowano z zatok okołososowych oraz z mózgu *Riemerella anatispestifer*. W trakcie odchowu w stadzie tym diagnozowano również aspergilozę. Uznano, że zakażenie wirusem powodującym zmiany w narządach limfatycznych ma charakter immunosupresyjny, co predysponuje do wtórnych zakażeń bakteryjnych i grzybiczych, a w konsekwencji do dużych strat ekonomicznych.

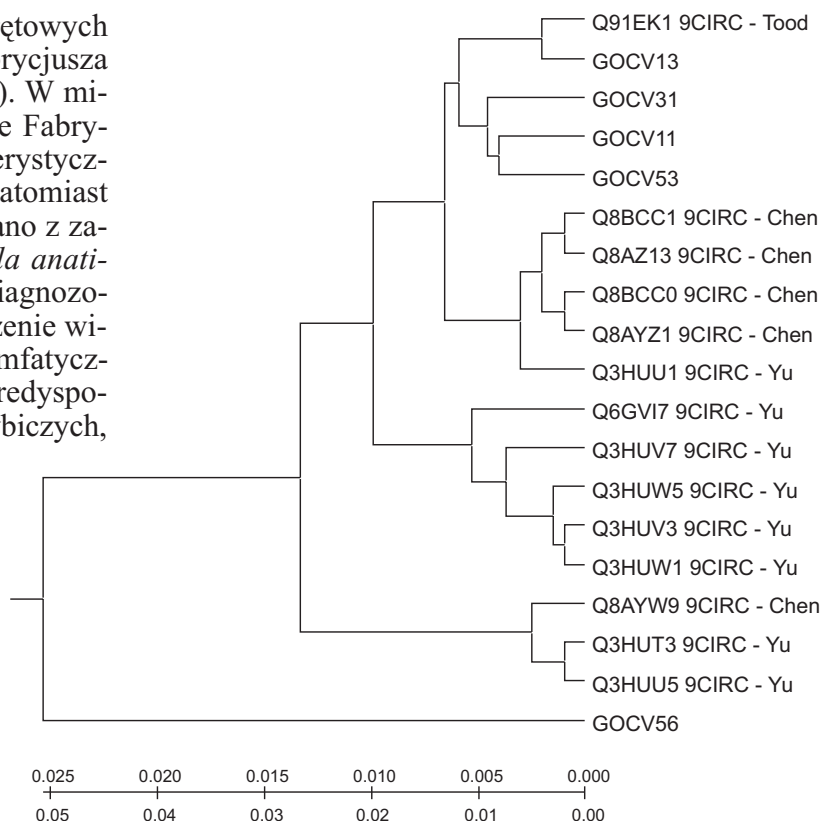
Od tej pory w wielu krajach świata z rozwiniętą, intensywną produkcją gęsi rozpoczęto monitoringowe badania, mające na celu wyjaśnienie przyczyn problemów w produkcji. W badaniach tych uwzględniono również zakażenia wirusowe, w tym cirkowirusowe (1, 2, 7, 10). Również w Polsce podjęto próbę określenia prewalencji zakażeń cirkowirusowych w stadach gęsi towarowych.

Celem badań było określenie częstotliwości i występowania zakażeń GoCV w stadach gęsi w południowo-zachodniej Polsce oraz charakterystyka molekularna izolatów.

Materiał i metody

Pomiędzy kwietniem a sierpniem 2005 r. od 95 padłych ptaków pochodzących z 40 ferm gęsi z terenów południowo-zachodniej Polski pobrano śledziony lub/i bursę Fabrycjusza celem izolacji genomowego DNA. W trakcie pobierania prób u ptaków nie stwierdzano istotnych objawów klinicznych choroby ani zmian patologicznych. Zgromadzone próbki do czasu izolacji DNA przechowywano w temperaturze -20°C . Przed przystąpieniem do izolacji DNA tkanki homogenizowano. Izolację DNA przeprowadzono z zastosowaniem DNeasy kit (QIAGEN), zgodnie z protokołem załączonym przez producenta.

Do identyfikacji zakażeń GoCV zastosowano metodę PCR z użyciem pary starterów dla sekwencji genu rep GoCV: P₃₂₈f 5'-GAC GAA GAT AAT GAA GAA TAT T-3' i P₇₁₅r 5'-AAG GCA GCC ACC CAT A(A/G)A AAT-3' (3). Zastosowana reakcja została zoptymalizowana. Mieszanka reakcyjna o objętości 25 μl zawierała: 16,5 μl wody dejonizowanej; 2,5 μl 10 \times stężonego buforu Tag z jonami MgCl_2 ; 1 μl Polimerazy RedTag (Sigma); 2,5 μl mieszaniny nukleotydów (0,2 nM każdego z czterech dNTP); 0,25 μl każdego ze starterów (0,1 μM) oraz 2 μl wyizolowanego DNA. Reakcję PCR przeprowadzono w następujących warunkach: wstępna denaturacja 94°C przez 5 min., następnie 30 cykli – denaturacja: 94°C przez 1 min., przyłączanie starterów: 55°C przez 1 min. i synteza komplementarnego DNA: 72°C przez 1 min. oraz końcowa elongacja: 72°C przez 7 min. Wizualizację produktu o długości 388 bp dokonano w 1,5% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydy. Uzyskane produkty, dla po-



Ryc. 1. Drzewo filogenetyczne wykreślone na podstawie sekwencji białka C1 polskich GoCV i pochodzących z GenBank

twierdzenia, zostały zsekwencjonowane w Oligo IBB Warszawa z użyciem ww. pary starterów.

Kolejnym etapem badań była amplifikacja fragmentu C1 genomu wirusa GoCV (nukleotydy od 1761 do 1009). W tym celu próby genowego DNA pochodzące od gęsi, w których wykryto GoCV, poddano dwóm kolejnym reakcjom PCR z dwoma parami starterów: zestaw 1: 5' TAA ATG CGA GTT TGA TGT GTC T-3', i 5'-CAT TTA ACC CCT TCC AAA GAG T-3' (nukleotydy od 1401 do 837) oraz zestaw 2: 5'-GTG TGC CTT CTT TCT CTC C-3' i 5'-CTG CGT AGG GGT CTA TGT TC-3' (nukleotydy od 1290 do 226). Uzyskane produkty poddano sekwencjonowaniu w obu kierunkach w Oligo IBB Warszawa. Sekwencje złożono i porównano w programie BioEdit metodą Clustal, a następnie dokonano translacji. Uzyskane sekwencje porównano także z sekwencjami fragmentów C1 genomu GoCV wcześniej izolowanymi na świecie i wcześniej umieszczonymi w bazie danych GenBank. Analizę filogenetyczną przeprowadzono w programie MEGA 4 i uzyskano dendrogram (ryc. 1).

Wyniki i omówienie

W przeprowadzonych badaniach wykryto metodą PCR GoCV w narządach wewnętrznych 18 (18,9%) ptaków pochodzących ze stad towarowych gęsi z terenu zachodnio-południowej Polski. Zbadane próbki od ptaków w wieku 1-3 dni nie wykazały obecności genomu GoCV, natomiast u ptaków starszych, 5-7-tygodniowych, jak i pod koniec tuczu, tj. 14-16-tygodniowych wykazano obecność genomu GoCV, odpowiednio, u 33,3% i 46,1%. Zakażone ptaki pochodzi-

Tab. 1. Wyniki badań w kierunku GoCV

Wiek gęsi	Liczba gęsi badanych w kierunku obecności GoCV	Liczba (%) potwierdzeń GoCV wykrytych metodą PCR w narządach wewnętrznych gęsi	Liczba (%) stad gęsi badanych w kierunku obecności GoCV	Liczba (%) stad gęsi z obecnością GoCV wykrytych metodą PCR
1-3 dni	51	0 (0,0)	17	0 (0,0)
5-7 tygodni	18	6 (33,3)	8	5 (62,5)
14-16 tygodni	26	12 (46,1)	15	9 (60,0)
Ogółem	95	18 (18,9)	40	14 (35,0)

ły z 14 różnych stad (35,0%), przy czym w stadach gęsi powyżej 5 tygodni życia częstość zakażeń wynosiła ponad 60% (tab. 1).

W ramach badań przeprowadzonych przez autorów, uzyskano 5 różnych sekwencji genu C1 kodującego białko kapsydu polskich izolatów GoCV (nukleotydy 1009-1761). Porównano je z sekwencjami GoCV izolowanymi wcześniej na całym świecie, pozyskanymi z bazy danych GenBank. Stwierdzono, że sekwencje badanych nukleotydów genu C1 polskich izolatów GoCV wykazują od 99% do 84% podobieństwo z sekwencjami izolatów pochodzącymi z Niemiec, Chin i Tajwanu. Analiza filogenetyczna tego genu wykazała, że tworzą jeden duży klastery, wyraźnie wyodrębniając polski izolat GOCV56, którego sekwencja nukleotydów jest nieco odmienna od zawartych w GenBank. Z kolei w obrębie tej dużej grupy wyodrębniają się mniejsze klaster – izolaty azjatyckie tworzące 3 mniejsze grupy, oraz czwarta „europejska” zawierająca izolat niemiecki z czterema polskimi (GOCV13, GOCV31, GOCV13 i GOCV53) (ryc. 1).

Podobny monitoring stad gęsi towarowych w kierunku zakażeń GoCV przeprowadzony na Węgrzech w latach 2000-2001 obejmował 76 stad gęsi (1). Obecność DNA cirkowirusa gęsi (GoCV) (metoda PCR) wykazano u 64,5% ptaków pochodzących z 49 różnych stad. Objawy kliniczne choroby obserwowano jedynie w 33 stadach pozytywnych w kierunku zakażenia GoCV. Manifestowały się one kulawiznami, opóźnieniem rozwoju, objawami ze strony układu oddechowego i nerwowego oraz ogólną złą kondycją ptaków. Kulawizny i opóźnienie rozwoju były najczęstszymi z notowanych objawów (odpowiednio, w 21 i 7 stadach). Zmiany histopatologiczne w bursie Fabrycjusza, typowe dla zakażenia cirkowirusami, potwierdzono jedynie u ptaków pochodzących z 3 stad. Dodatkowo przeprowadzone na Węgrzech badania laboratoryjne w monitorowanych stadach pozwoliły na zdiagnozowanie infekcji reowirusowych, parwowirusowych, polyomawirusowych oraz zakażeń wywołanych przez *Salmonella*, *Pasteurella*, *Mycoplasma*, *Streptococcus* i *Candida*. W większości przypadków infekcje te stwierdzano zarówno w stadach zakażonych, jak też niezakażonych cirkowirusami gęsi. Zdecydowanie częściej (wykazano dodatnią korelację) w stadach zakażonych GoCV stwierdzano infekcje reowirusowe (odpowiednio, 38,6% w stadach GoCV

pozytywnych i 14,8% w stadach GoCV negatywnych). Autorzy węgierscy wykonali również analizę wieku zakażonych ptaków. Wykazała ona, że podobnie jak w Polsce, zakażenia GoCV występowały bardzo rzadko u gęsi młodszych niż 5 tygodni (3,8% wszystkich wyników pozytywnych). Autorzy węgierscy sugerują, że młode gąsienki do 3.-4. tygodnia życia mogą chronić przed infekcją przeciwciała matczyne.

Z drugiej strony, obecność wirusa u 1-tygodniowych ptaków nasuwa podejrzenie, że GoCV, podobnie jak inne wirusy z rodziny *Circoviridae*, szerzy się również drogą pionową (wertykalną).

Badania prowadzone przez Chen i wsp. (2) w populacji gęsi na Tajwanie potwierdziły endemiczne występowanie zakażeń cirkowirusem gęsi. Obecność DNA GoCV stwierdzono w 16 (76,2%) na 21 badanych stadach gęsi pochodzących z różnych ferm zlokalizowanych na całym obszarze kraju. Autorzy podkreślają, że objawy kliniczne (najczęściej około 9. tygodnia odchowu) w postaci zahamowania wzrostu i zaburzenia w pierzeniu obserwowano u 5-30% ptaków na wszystkich fermach.

Intensywnie prowadzone są również badania filogenetyczne genomu GoCV (2, 10). Poznano całkowitą sekwencję genomowego DNA wirusa GoCV (12). Genom tego wirusa ma wielkość 1821 nukleotydów i zawiera dwie główne ramki odczytu V1 i C1, które kodują, odpowiednio, białka związane z replikacją (Rep) i białka kapsydu. Genom GoCV zawiera również dwie mniejsze ramki odczytu – V2 i C2, których funkcja pozostaje nieznana. Porównanie sekwencji cirkowirusów wykazało, że GoCV posiada genom, którego cechy są wspólne z gnomem cirkowirusów świń (PCV1, PCV2) oraz choroby dzioba i piór papug (BFDV). Co więcej, wirus ten wykazuje homologię sekwencji aminokwasów białka C1 z ww. cirkowirusami na poziomie od 43,2% do 46,4%, a białka Rep od 22,3% do 29,1% (2).

Kolejne badania całych genomów wirusów przeprowadzone przez Chen i wsp., jak i Johne i wsp. (3, 4) wykazały wyraźną homologię genomu cirkowirusów izolowanych od gęsi (GoCV) i kaczek (DuCV). Analiza filogenetyczna wykazała, że izolaty GoCV i DuCV tworzą jeden klastery wyodrębniony z pozostałych cirkowirusów izolowanych od ptaków i izolowanych od świń.

Analiza genomu GoCV pozwoliła wykazać, że izolaty tego wirusa należą do trzech różnych grup genetycznych. Różnice nukleotydów pomiędzy poszczególnymi grupami wynoszą około 7%, a w poszczególnych grupach mniej niż 1%. Przypuszcza się, że wirusy należące do tych grup, w tym jedna z Niemiec i dwie z Tajwanu, krążą po Europie i Azji. Nie wykazano dotychczas różnic w patogenności pomiędzy wirusami należącymi do poszczególnych grup (2, 10).

Reasumując, należy podkreślić, że przeprowadzone badania na świecie, jak i w Polsce wskazują na wysoką częstość zakażeń GoCV w stadach towarowych gęsi. Jednoznaczna rola cirkowirusów gęsi w powodowaniu bezpośrednich strat na fermach może być dyskusyjna, niemniej rola pośrednia jako czynnika immunosupresyjnego, choć wymaga prowadzenia dalszych badań, jest oczywista. Potwierdzeniem immunosupresyjnego działania GoCV może być fakt obserwowania zmian histopatologicznych w narządach limfatycznych – deplecję limfocytów oraz wzrost liczby histiocytów w bursie Fabricjusza, śledzionie i grasicy (9).

Piśmiennictwo

1. Ball N. W., Smyth J. A., Weston J. H., Borghmans B. J., Palya V., Glavits R., Ivanics E., Dan A., Todd D.: Diagnosis of goose circovirus infection in Hungarian geese samples using polymerase chain reaction and dot blot hybridization tests. *Avian Pathol.* 2004, 33, 51-58.
2. Chen C.-L., Chang P. C., Lee M. S., Hien J. H., Ou S. J., Shieh H. K.: Nucleotide sequences of goose circovirus isolated in Tajwan. *Avian Pathol.* 2003, 32, 165-171.
3. Chen C.-L., Wang P.-X., Lee M.-S., Shien J.-H., Shieh H. K., Ou S.-J., Chen C.-H., Chang P.-C.: Development of a polymerase chain reaction procedure for detection and differentiation of duck and goose circovirus. *Avian Dis.* 2006, 50, 92-95.
4. Johne R., Fernandez-de-Luaco D., Hofle U., Muller H.: Genome of a novel circovirus of starlings, amplified by multiply primed rolling-circle amplification. *J. Gen. Virol.* 2006, 87, 1189-1195.
5. Glávits R., Ferenczi E., Ivanics E., Bakonyi T., Mató T., Zarka P., Palya V.: Co-occurrence of West Nile Fever and circovirus infection in a goose flock in Hungary. *Avian Pathol.* 2003, 34, 408-414.
6. Samorek-Salamonowicz E., Czekaj H., Kozdrun W.: Choroby zakaźne występujące u drobiu wodnego. *Medycyna Wet.* 1998, 54, 305-308.
7. Smyth J., Soike D., Moffett D., Weston J. H., Todd D.: Circovirus-infected geese studied by in situ hybridization. *Avian Pathol.* 2005, 34, 227-232.
8. Soike D., Kohler B., Albrecht K.: A circovirus-like infection of geese related to a runting syndrome. *Avian Pathol.* 1999, 28, 199-202.
9. Todd D.: Circoviruses: immunosuppressive threats to avian species: a review. *Avian Pathol.* 2000, 29, 373-394.
10. Todd D., Feston J. H., Soike D., Smyth J. A.: Genome sequence determinations and analyses of novel circoviruses from goose and pigeon. *Virology* 2001, 286, 354-362.
11. Ziomko I., Kuczyńska E., Samorek-Salamonowicz E., Czekaj H.: Wpływ inwazji żołądkowo-jelitowych na serokonwersję po szczepieniu przeciwko chorobie Derzsyego u gęsi. *Medycyna Wet.* 1998, 54, 268-270.

Adres autora: dr Maciej Kuczkowski, pl. Grunwaldzki 45, 50-366 Wrocław; e-mail: maciej.kuczkowski@up.wroc.pl