

SEKVENCIIRANJE CELOTNEGA GENOMA VIRUSA PRAŠIČJE EPIDEMIČNE DIAREJE S TEHNOLOGIJO ION TORRENT

Manica Ipavec¹, Urška Kuhar¹, Darja Kušar¹, Bojan Papić¹, Simon Koren², Nataša Toplak², Ivan Toplak^{1*}

¹Inštitut za mikrobiologijo in parazitologijo, Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta; ²Omega d.o.o, Ljubljana, Slovenija

ivan.toplak@vf.uni-lj.si

Klinični primeri prašičje epidemične diareje (PED) so se v Evropi prvič pojavili leta 2014, virus PED pa smo v Sloveniji prvič potrdili januarja 2015 z metodo verižne reakcije s polimerazo v realnem času. Določanje celotnega genoma virusa PED smo izvedli iz vzorcev blata prašičev, ki smo jih v okuženi reji odvzeli septembra 2015. Za določitev zaporedja celotnega virusnega genoma smo uporabili visoko zmogljivo tehnologijo Ion Torrent. Analiza celotnega genoma virusa PED SLO/JH-11/2015 ter filogenetska primerjava z drugimi sevi PEDV sta potrdila, da je ugotovljeni sev virusa PED genetsko zelo podoben predhodno opisanim sevom SINDEL iz Nemčije, Francije in Belgije. Genom PEDV, ki smo ga določili v tej raziskavi, je po naših podatkih šele četrti objavljen celotni genom PEDV v Evropi in prvi objavljen genom PEDV v Sloveniji.

Ključne besede: Virus prašičje epidemične diareje; diagnostika; določitev celotnega genoma; prašič

Uvod

Prašičja epidemična diareja (PED) je zelo kužna virusna bolezen, ki so prvič opisali leta 1971 v Angliji. Leta 1978 so odkrili, da je njen povzročitelj nov koronavirus (1). Virus prašičje epidemične driske (PEDV) uvrščamo med alfakoronaviruse. Po prvih opisanih primerih v Angliji so o virusu poročali tudi iz drugih evropskih držav, kot so Belgija, Nizozemska, Nemčija, Francija. PED so v nadaljevanju v Evropi ugotavljali le sporadično, leta 2005 pa so zabeležili obsežno epidemijo PED v severni Italiji. V Aziji so v številnih primerih poročali o driski pri prašičih, ki jo povzroča PEDV. O prvih pojavih PEDV v Združenih državah Amerike so poročali maja leta 2013, v naslednjih mesecih pa že v 25 zveznih državah. Virus se je razširil tudi v druge države Severne in Latinske Amerike, kot so Kanada, Mehika, Peru, Ekvador, Dominikanska Republika in Kolumbija (2). Leta 2014 je bila v ZDA so odkrili novo genetsko različico seva PEDV, sev OH851, ki ima insercije in delecije v proteinu S, v nadaljevanju so podobne seve poimenovali kot sevi SINDEL (3). Leta 2014 so prisotnost sevov SINDEL potrdili tudi v Nemčiji, Franciji, Belgiji in na Japonskem (2). V Sloveniji smo prvi klinični primer prašičje epidemične driske zaznali decembra 2014, PEDV pa smo v okuženi reji potrdili z metodo RT-PCR v realnem času januarja 2015 (4).

Virus PED prizadene prašiče vseh starosti, vendar le pri sesnih pujskih, do starosti enega tedna, prihaja do visoke mortalitete. Bolezen se primarno kaže kot obilna vodena driska, ki po nekaj dneh postopoma preneha. Poleg tega lahko pri prašičih opazimo še bruhanje, neješčnost in povišano telesno temperaturo. Oboleli sesni pujski navadno hitro poginejo zaradi dehidracije (5).

Material in metode

Izolacijo virusne RNA iz vzorcev fecesa smo opravili s komercialnim kompletom »QIAamp viral RNA kit« (Qiagen, Hilden, Nemčija), pri čemer smo upoštevali navodila proizvajalca. V nadaljevanju smo vzorce dodatno obdelali še z reagentom TRIzol po standardnem protokolu. Pripravo knjižnice RNA za nadaljnje sekvenciranje smo izvedli s komercialnim kompletom »Ion total RNA sequencing kit v2« (Thermo Fisher Scientific – Ion Torrent, Carlsband, CA, USA). Za namnožitev tarčnih fragmentov DNA z emulzijskim PCR smo uporabili komplet »Ion PGM template OT2 200 kit« (Thermo Fisher Scientific – Ion Torrent). Določitev zaporedja virusne nukleinske kisline smo izvedli s platformo na »Ion PGM System«, uporabo kompleta »Ion PGM HiQ sequencing kit« in čipa »Ion 314 Chip v2« (Thermo Fisher Scientific – Ion Torrent). Za analizo zaporedij in sestavitev celotnega virusnega genoma smo dobljene rezultate primerjali z nemškim referenčnim sevom L00721/2014 iz podatkovne zbirke NCBI GenBank (dostopna številka LM645057). Analizo zaporedij smo izvedli s programsko opremo DNASTar Lasergene v.10.1.1 (DNASTar, Inc., Madison, WI, USA).

Rezultati

Sestavljen genom slovenskega seva PED SLO/JH-11/2015 je bil dolg 28.028 nukleotidov (nt), brez poli-A repa. Po analizi sestave genoma smo ugotovili, da je osnovna organizacija genoma enaka kot pri predhodno opisanem belgijskem sevu 15V010 (KR003452). V pridobljenem zaporedju smo določili bralne okvirje: ORF1a, ORF1b, protein receptorja, membranski protein, nukleoprotein ter protein ovojnice.

Nadalje smo pridobljeno zaporedje celotnega genoma in zaporedje, ki kodira protein S (ang. *spike* - S) primerjali z 48 celotnimi genomi PEDV, ki so na voljo v podatkovni zbirki NCBI GenBank. Slovenski sev je bil filogenetsko najsorodnejši (i) francoskemu sevu FR/001/2014 z 99,8 % podobnostjo in s 44 nukleotidnimi razlikami, (ii) nemškemu sevu GER/L00719/2014 (LM645057) z 99,8 % podobnostjo in 49 nukleotidnimi razlikami, ter (iii) belgijskem sevu BEL/15V010/2015 z 99,7 % podobnostjo in 93 nukleotidnimi razlikami. V primerjavi s prvim SINDEL sevom OH851 (KJ399978) se genom našega seva razlikuje v 185 nukleotidih, kar je 99,3 % podobnost obeh genomov. Omenjenim sevom so filogenetsko blizu tudi drugi severnoameriški sevi, kot na primer USA/Indiana12.83/2013 (KJ645635) z 99,6 % podobnostjo, USA/Minnesota52/2013 (KJ645704) z 99,4 % podobnostjo, USA/Iowa106/3013 (KJ645695) z 99,4 % podobnostjo in USA/Ohio126/2014 (KJ645702) z 99,1 % podobnostjo. Poleg ameriških sevov smo odkrili visoko, 99,3 % podobnost tudi z južnokorejskim sevom iz leta 2014 KNU-1406-1 (KM403155). V primerjavo smo vključili tudi prvi znan sev PEDV iz Anglije, CV777 (AF353511). Podobnost s slovenskim sevom je bila v tem primeru manjša, in sicer 97,0 %. Filogenetsko najbolj oddaljeni so bili nekateri azijski sevi, kot na primer južnokorejski sev SM98 (GU937797) iz leta 2011 s 96,7 % podobnostjo, kitajski sev LZC (EF185992) iz leta 2007 s 96,7 % podobnostjo in tajski sev EAS1 (KR610991) iz leta 2014 s 96,6 % podobnostjo nukleotidnega zaporedja.

Podobne rezultate smo dobili tudi pri filogenetski analizi zaporedij proteina S, pri kateri smo ugotovili veliko podobnost s prej omenjenim francoskim sevom FR001/2014 (99,8 %), nemškim sevom L00791/2014 (99,7 %), belgijskim sevom 15V010 (99,5 %), južnokorejskim sevom KNU-1406 (99,4 %) ter ameriški sevi USA/Minnesota35/2013 (99,5 %), USA/Indiana12.83/2013 (99,5 %), USA/Ohio126/2014 (99,4 %) in OH815 (99,4 %).

Podobnost z angleškim sevom CV777 v proteinu S je bila 95,7 %. Predhodne rezultati potrjuje tudi primerjava aminokislinskega zaporedja proteina S, pri čemer so podobnosti

s sevi, ki so filogenetsko najbližje slovenskemu sevu, presegale 99 %, medtem ko je bila podobnost z angleškim sevom CV777 96,1 %. Največje razlike v aminokislinskem zaporedju proteina S smo odkrili v primerjavi s tajskima sevoma CBR1 (KJ610993) ter EAS1 iz leta 2014, katerih podobnost s slovenskim sevom je znašala le 93,8 %.

Razprava

Genom virusa PED SLO/JH-11/2015 je prvi celotni virusni genom, ki je bil sekvenciran na področju veterinarske medicine v Sloveniji. Z izvedeno raziskavo nam je uspelo prikazati, da lahko s tehnologijo Ion Torrent določimo celoten genom PEDV po izolaciji virusne nukleinske kisline neposredno iz vzorcev blata. Pri tem ugotavljamo, da uporaba specifičnih začetnih oligonukleotidov ni nujno potrebna, kar daje posebno vrednost temu pristopu, saj omogoča identifikacijo katerega koli patogena v vzorcu.

Analiza zgradbe genoma PEDV in njegova primerjava z drugimi sevi, ki so na voljo v genski bazi podatkov, kaže na to, da je ugotovitev PED SLO/JH-11/2015 v Sloveniji posledica vnosa SINDEL seva, ki je bil pred tem že ugotovljen v Evropi. To potrjujejo tudi filogenetske primerjave, kjer največjo podobnost ugotavljamo s tremi predhodno ugotovljenimi sevi iz Nemčije, Francije in Belgije.

Določitev in poznavanje celotnega zaporedja slovenskega seva PEDV prispeva k boljšemu razumevanju epizootiološke situacije tako v Sloveniji kot tudi v Evropi. Prav tako je to tudi korak naprej v poznavanju in razumevanju samega virusa PED in uvajanje nove tehnologije v področje raziskav.

Uporabljena tehnologija nove generacije sekvenciranja Ion Torrent je novost na področju slovenske veterinarske virologije. Izkušnje in znanja, ki smo jih pridobili tekom določanja prvega genoma PEDV, bodo olajšala nadaljnja raziskovanja, nova tehnologija pa ima potencial, da korenito izboljša naše razumevanje epidemiologije, genetike in genomike PEDV kot tudi številnih drugih povzročiteljev bolezni v veterinarski medicini.

Celotno nukleotidno zaporedje PEDV seva SLO/JH-11/2015 je v podatkovni zbirki NCBI GenBank objavljeno pod dostopno številko KU297956.

Reference

1. Pensaert MB, De Bouck P. A new coronavirus-like particle associated with diarrhea in swine. *Arch Virol* 1978; 58: 243-247.
2. Carvajal A, Argüello H, Martínez-Lobo FJ, et al. Porcine epidemic diarrhoea: new insights into an old disease. *Porcine Health Management* 2015; 1: 12
3. Wang L, Byrum B, Zhang Y. New variant of porcine epidemic diarrhea virus, United States, 2014. *Emerg Infect Dis* 2014; 20: 917-919.
4. Toplak I, Ipavec M, Kuhar U, et al. Complete genome sequence of the porcine epidemic diarrhea virus strain SLO/JH-11/2015. *Genome Announc* 2016; 4(2): e01725-15.
5. Jung K, Saif LJ. Porcine epidemic diarrhea virus infection: Etiology, epidemiology, pathogenesis and immunoprophylaxis. *The Veterinary Journal* 2015; 204: 134-143.

Whole genome sequencing of the porcine epidemic diarrhea virus by Ion Torrent sequencing technology

In 2014, the first clinical case of porcine epidemic diarrhoea (PED) in Europe was described. In January 2015, the first PED virus-infected herd in Slovenia was confirmed by polymerase chain reaction. The determination of the whole viral genome has been conducted from stool samples, collected from infected herd in September 2015. Ion Torrent next-generation sequencing technology has been used for the first time. Whole genome analysis of PEDV strain SLO/JH-11/2015 and the phylogenetic comparison with the other PEDV strains have confirmed the emergence of previously confirmed SINDEL strain identified in Germany, France and Belgium. The PEDV genome obtained in this research is, according to our knowledge, the fourth published whole genome of PEDV in Europe and the first in Slovenia.

Key words: Porcine epidemic diarrhea virus; diagnostics; whole genome sequencing; pig