

PRVA UGOTOVITEV REKOMBINANTNIH SEVOV VIRUSOV PED PRI PRAŠIČIH Z DRISKO V SLOVENIJI

Ivan Toplak^{1*}, Darja Kušar¹, Bojan Papić¹, Tonček Gider², Marina Štukelj³, Urška Kuhar¹

¹Inštitut za mikrobiologijo in parazitologijo, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana ²Panvita, Veterina d.o.o., Murska Sobota, ³Klinike za reprodukcijo in velike živali, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

ivan.toplak@vf.uni-lj.si

Prvi uradno potrjen primer okužbe z virusom prašičje epidemične driske (PED) smo pri prašičih v Sloveniji dokazali na začetku leta 2015. Okužba z virusom PED povzroča vodeno drisko in dehidracijo, pri sesnih pujskih pa tudi visoko smrtnost. Prašičji respiratorni koronavirus (PRCV) je endemično prisoten v večini rej prašičev in redko povzroča blage respiratorne okužbe. V izvedeni študiji smo pri 18 PEDV pozitivnih vzorcih sekvencirali produkte PCR po Sangerju in v dveh pozitivnih vzorcih posumili na prisotnost rekombinantnega seva virusa. Z metodo sekvenciranja naslednje generacije Ion Torrent smo določili celotni genom virusa PED SLOreBAS/2015 (28.021 nukleotidov). Na poziciji genoma od 20.865 do 21.255 v dolžini 390 nt smo pri tem sevu ugotovili del genoma PRCV s 97% identičnostjo s sevom Italy/213306/2009 in le 88% identičnostjo s PED SINDEL sevi, kar potrjuje, da gre za rekombinantni sev virusa. Drugi rekombinantni sev smo potrdili v še eni reji v marcu leta 2016. Ti novi rekombinantni sevi ne predstavljajo samo nevarnosti za nastanek bolj patogenih sevov za prašiče, povzročajo tudi težave v diagnostiki in lahko predstavljajo potencialno nevarnost za človeka, zato novih koronavirusnih okužb pri prašičih ne bi smeli podcenjevati.

Ključne besede: virus prašičje epidemične diareje; rekombinantni sevi; Ion Torrent sekvenciranje, diagnostika

Uvod

Virus prašičje epidemične driske (PEDV) in prašičji respiratorni koronavirus (PRCV) sta uvrščena v rod Alphacoronavirus, družine Coronaviridae. Genom obeh virusov je pozitivno polarna molekula RNA, ki je velika približno 28.000 nukleotidov. Koronavirusi se evolucijsko prilagajajo gostitelju s spreminjanjem genoma, ki je posledica akumuliranja točkovnih mutacij in homolognih rekombinacij med sorodnimi virusi. Genoma PEDV in PRCV se na nivoju nukleotidnega zaporedja med seboj razlikujeta za 40%. Okužba prašičev z virusom PED povzroča vodeno drisko, dehidracijo pri vseh kategorijah prašičev, pri sesnih pujskih pa tudi visoko smrtnost. PRCV se je v 80-ih letih prejšnjega stoletja prvič pojavil kot mutanta virusa kužnega vnetja želodca in črevesja (TGE) in pri prašičih povzroča le blage okužbe dihal. Hitro širjenje PRCV je povzročilo izginotje TGE, medtem ko je PRCV v prašičjih rejah endemično prisoten. Med leti 2010 in 2012 so okužbe z visoko patogenimi sevi virusi PED zaznali na Kitajskem, v letih od 2013 do 2014 v ZDA, Kanadi in Mehiki, od leta 2014 naprej pa jih zaznavamo tudi v Evropi. Prvi uradno potrjen primer okužbe z virusom PED smo dokazali v Sloveniji za začetku leta 2015 (1). V začetku leta 2016 so raziskovalci iz Italije (2) in Nemčije (3) poročali o ugotovitvi dveh rekombinantnih sevov med PEDV in PRCV, ki so jih dokazali v blatu prašičev z drisko. Zaradi teh dveh predhodnih poročil smo postali pozorni na morebiten pojav rekombinantnih sevov tudi pri nas.

Material in metode

V 20 rejah pitancev, kjer je veterinar na podlagi kliničnih znakov hude driske postavil sum na PED, smo iz boksov obolelih prašičev skupno vzorčili 84 vzorcev blata. Iz vzorcev blata smo v gojišču RPMI pripravili suspenzije, iz katerih smo s kitom QIAamp Viral RNA Mini kit (Qiagen, Nemčija) izolirali nukleinske kisline. Za dokazovanje virusov PED oziroma TGE in hkrati za razlikovanje med tema dvema virusoma smo uporabili metodo RT-PCR v realnem času (Virotype PEDV/TGEV, Qiagen, Nemčija), ki specifično pomnožuje odsek gena, ki kodira protein S. V pozitivnih vzorcih smo s klasično metodo RT-PCR pomnožili 390 nukleotidov dolg odsek gena v virusnem genomu, ki kodira od RNA odvisno polimerazo RNA in produkte PCR sekvencirali po Sangerju. Vzorec blata, v katerem smo posumili na prisotnost rekombinantnega virusa, smo uporabili za sekvenciranje z metodo sekvenciranja naslednje generacije (NGS) Ion Torrent in določili celotni genom virusa PED. Nukleotidna zaporedja smo primerjali s podatki v genski banki s pomočjo programov BLAST in DNASTAR

Rezultati

V 18 vzorcih smo s specifično metodo PCR v realnem času dokazali prisotnost nukleinske kisline virusa PED, dobljene vrednosti Ct so bile med 16 in 33. Filogenetska primerjava nukleotidnega zaporedja 18 pozitivnih vzorcev v dolžini 390 nukleotidov gena za virusno polimerazo je pri 16 pozitivnih vzorcih pokazala 99,7 do 100% medsebojno identičnost in od 99,0 do 99,7% identičnost s sevi PED SINDEL, ki so bili ugotovljeni v zadnjih dveh letih v Evropi. V dveh vzorcih smo ugotovili prisotnost nukleinske kisline PRCV s 97,4% identičnostjo sevu PRCV ISU1-2006 (DQ811789), ostalih 16 pozitivnih vzorcev pa je kazalo le 66,2 do 66,7% identičnost nukleotidnega zaporedja. Na podlagi te ugotovitve smo posumili, da se v teh dveh pozitivnih vzorcih nahaja rekombinantni sev virusa PED/PRCV. Pozitivnemu vzorcu PED SLOreBAS/2015 smo določili zaporedje celotnega genoma virusa, ki znaša 28.021 nukleotidov. Ugotovili smo, da je sev SLOreBAS/2015 99,7% identičen sevu FR/001/2014 iz Francije. V genomu seva SLOreBAS smo na poziciji od 20.865 do 21.255 v dolžini 390 nt ugotovili del genoma PRCV z 97% identičnostjo z rekombinantnim sevom Italy/213306/2009 in le 88% identičnostjo s SINDEL sevi, kar potrjuje da gre za rekombinantni sev virusa. Oba rekombinantna seva smo ugotovili v dveh različnih rejah pri prašičih s kliničnimi primeri driske in sumom na PED, v prvi reji v novembru leta 2015 in v drugi reji v marcu leta 2016.

Razprava

V Slovenijo se uvaža veliko število živih prašičev iz različnih držav, brez poznanega zdravstvenega statusa. Prašiči prihajajo iz velikega števila različnih rej, kar povečuje možnosti vnosa novih sevov in nastanka novih kombinacij virusov. Zaradi kroženja genetsko dveh različnih virusov (PRCV/PEDV) v rejah nastajajo tudi novi rekombinantni sevi, prav tako se lahko ti sevi vnesejo z uvozom prašičev. Ti novi rekombinantni sevi pa ne predstavljajo samo nevarnosti za nastanek bolj patogenih sevov za prašiče, povzročajo tudi težave v diagnostiki in lahko predstavljajo potencialno nevarnost za človeka, saj je v preteklosti bilo že večkrat dokazano, da so koronavirusne okužbe človeka (MERS in SARS) bile posledica prenosa iz živali. Zaradi tega ima lahko pomanjkljivo zatiranje in podcenjevanje pojavljanja novih koronavirusnih okužb (PEDV) pri prašičih tudi daljnosežne posledice. V Sloveniji smo v tej študiji prvič dokazali prisotnost rekombinantnih sevov virusov PED.

Reference

1. Toplak I, Ipavec M, Kuhar U, Kušar D, Papić B, Koren S, Toplak N. Complete Genome Sequence of the Porcine Epidemic Diarrhea Virus Strain SLO/JH-11/2015. *Genome Announc* 2016; 4(2) e01725-15.
2. Boniotti MB, Papetti A, Lavazza A et al. Porcine Epidemic Diarrhea Virus and Discovery of a Recombinant Swine Enteric Coronavirus, Italy. *Emerg Infect Dis* 2016; 21: 83–87.
3. Akimkin V, Beer M, Blome S et al. New chimeric porcine coronavirus in swine feces, Germany 2012. *Emerg Infect Dis* 2016, <http://dx.doi.org/10.3201/eid2207.160179>.

First detection of recombinant strains of PEDV in pigs with diarrhea in Slovenia

At the beginning of 2015 the first officially confirmed case of infection with porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) was detected in pigs in Slovenia. PEDV infection causes watery diarrhea, dehydration and a high mortality rate in piglets. Porcine respiratory coronavirus (PRCV) is endemically present in the majority of pig holdings and causes mild respiratory infection. This study was conducted first by Sanger sequencing of 18 PEDV PCR positive samples and two of them were suspected for the presence of a recombinant virus strains. By using the method of the next generation sequencing (Ion Torrent) the complete genome sequence of the virus SLOreBAS PED/2015 (28.021 nucleotides) was determined. In the position of the genome from 20.865 to 21.255 (390 nt) a part of the PRCV genome with 97% identity to the strain of Italy/213306/2009 and only 88% identity to PEDV SINDEL strains was found, confirming the identification of a recombinant virus strain. The second recombinant strain was confirmed in another pig herd in March 2016. These new recombinant strains not only pose a threat for the emergence of more pathogenic strains for pigs and cause problems in diagnostics, but may also represent a potential danger to humans, thus the new coronavirus infections in pigs should not be underestimated.

Key words: porcine epidemic diarrhea virus; recombinant strains Ion Torrent sequencing; diagnostics