

DOKAZ I TIPIZACIJA UZROČNIKA VIRUSNE ETIOLOGIJE U PROBAVNOM TRAKTU PURANA PRIMJENOM METODE SEKVENCIRANJA ČITAVOG GENOMA

Klarić, Lucija

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Veterinary Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:178:548706>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2023-03-23**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Veterinary Medicine -
Repository of PHD, master's thesis](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
VETERINARSKI FAKULTET**

Lucija Klarić

**DOKAZ I TIPIZACIJA UZROČNIKA VIRUSNE ETIOLOGIJE U
PROBAVNOM TRAKTU PURANA PRIMJENOM METODE
SEKVENCIRANJA ČITAVOG GENOMA**

Diplomski rad

Zagreb, 2021.

**Zavod za bolesti peradi s klinikom
Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu**

Predstojnik: doc. dr. sc. Željko Gottstein

Mentor: doc. dr. sc. Željko Gottstein

Članovi povjerenstva za obranu diplomskog rada:

- 1. doc.dr.sc. Maja Lukač**
- 2. doc.dr.sc. Željko Gottstein**
- 3. izv.prof.dr.sc. Danijela Horvatek Tomić**

Zahvala

Zahvaljujem se svojim roditeljima mami Ani i ćaći Duji koji su mi bili ogromna podrška tijekom cijelog obrazovanja, ne samo fakultetskog. Najviše im se zahvaljujem jer su imali iznimno puno razumijevanja tijekom mojih padova, ali su se svaki put potrudili da ponovno ustanem.

Hvala i mojoj babi Maruški koja se veselila svakom mom prođenom kolokviju i ispitu ka da ga je ona prošla. Hvala joj na svim onim kunama i jajima koje je čuvala za mene jer se bojala da neman šta jist u Zagrebu.

Hvala rođaku Makiju koji mi je čuva mater i pomaga ćaći dok mene nije bilo, koji me svaku put vozia na bus i dolazia po mene. Hvala mu jer nije ljut zato šta je zbog mog kukanja da ću past svaki ispit izgubia kosu i živce.

Jako puno hvala mom zaručniku Marku koji je virova u mene više nego šta sam ja ikad u životu. Hvala mu jer mi je bio najveći oslonac i rame za plakanje kada je god to tribalo, te mu ogromno hvala na svojoj ljubavi i pažnji koju mi poklanja iz dana u dan. Nadam se da ću biti makar upola dobra osoba ka šta je on.

Na kraju ali ne najmanje važno, zahvaljujem se svom mentoru doc.dr.sc. Željku Gottsteinu na velikoj pomoći i razumijevanju u izradi ovog rada.

Popis kratica

PEC - (poult enteric complex),

PEMS – (poult enteric and mortality syndrome),

LTS – (light turkey syndrome),

ORF – (opening reading frames),

TCoV – (koronavirus purana),

CRD – (kronična respiratorna bolest),

TARV – (turkey arthritis reovirus),

VP – (virusni protein),

RT-PCR – (lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu),

qPCR – (kvantitativna PCR),

MAstVs – (Mamastrovirus),

AAstVs – (Avastrovirus),

TAstVs – (astrovirus purana),

ANV – (avian nephritis virus),

NGS – (sekvenciranje nove generacije),

RNA – (ribonukleinska kiselina),

rRNA – (ribosomska RNA),

NCBI – (National Center for Biotechnology Information),

cDNA – (komplementarna DNA)

Popis priloga

Tablica 1. Rezultati po jatima za astro i rotaviruse u istraživanju s pripadajućom dobi.....	11
Slika 1. Filogenetsko stablo srađenjenih sekvenci puranskih astrovirusa primjenom računalnog programa Mega7 koristeći Neighbour-joining metodu i Bootstrap testiranje s 1000 replikata...	13

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	2
2.1. Koronavirusi	2
2.1 Reovirus	3
2.2 Rotavirusi	5
2.3. Astrovirusi	6
2.4. Metagenomika	8
3. MATERIJALI I METODE	9
3.1. Uzorci tkiva korišteni u istraživanju	9
3.2. Dokaz, karakterizacija virusa metagenomikom primjenom sekvenciranja nove generacije (NGS) te filogenetska analiza	10
4. REZULTATI	11
4.1. Metagenomika	11
5. RASPRAVA	14
6. ZAKLJUČAK	15
7. POPIS LITERATURE	16
8. SAŽETAK	17
9. SUMMARY	18
10. ŽIVOTOPIS	19

1. UVOD

U intenzivnoj peradarskoj proizvodnji, za očekivati je da očuvanje zdravlja probavnog sustava predstavlja jako važan zadatak kako bismo dobili maksimalan prirast. Brojne bolesti, kao što je PEC (engl. poult enteric complex) ne dozvoljavaju proizvodni maksimum. Kod purana je opisano nekoliko crijevnih bolesti kao što je virusni enteritis purana, sindrom maldigestije, malapsorpcijski sindrom, PEMS (engl.) i dr. Svi ti sindromi su uključeni u PEC, općeniti pojam koji opisuje zarazne crijevne bolesti purana. PEC je sa ekonomskog stajališta izrazito važna bolest koju karakteriziraju proljev, enteritis, smanjeno uzimanje hrane, zaostajanje u rastu, smanjen prirast i u nekim slučajevima visoki mortalitet. U etiologiju su uključeni brojni virusi (*Coronavirus*, *Rotavirus*, *Astrovirus*, *Reovirus*, *Adenovirus*), bakterije (*E. coli*, *Salmonela spp.*, *Clostridia*, *Campylobacter*) i protozoe, ali primarni uzročnik još uvijek nije ustanovljen. Virusni su primarni problem jer omogućuju uvjete za sekundarne bakterijske infekcije te rast i razvoj protozoa čime nastaju još veća oštećenja probavnog sustava. Nedavno su opisana dva nova sindroma kod purana u Minnesoti, a to su PES (engl.) i sindrom lakog purana ili LTS (engl.). PES je zarazna crijevna bolest purana koja se javlja u dobi od 1. dana do 7 tjedana starosti, a karakterizira je proljev, letargija, depresija i tekući sadržaj u slijepom crijevu. LTS je problem purana koji imaju nižu tjelesnu masu u usporedbi sa standardima pasmine. Vjeruje se da enteritis kod purica ranije životne dobi pomaže razvoju LTS-a u starijoj dobi. Crijevni virusi su čest uzrok primarnog oštećenja gastrointestinalnog trakta čime osiguravaju povoljne uvjete za rast bakterija i/ili protozoa koje uzrokuju daljnja oštećenja crijeva. (MOR i sur.,2014.; Cattoli, 2020.).

Cilj ovog istraživanja je primjenom sekvenciranja čitavog genoma virusa utvrditi pojavnost virusa na farmama purana te utvrditi moguću etiologiju ranih kliničkih pojava proljeva i gubitaka u proizvodnji, s ciljem poboljšanja biosigurnosnih i preventivnih mjera kao osnove proizvodnje.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Koronavirusi

Koronavirusi su pleomorfne čestice promjera od 50 do 200nm. Koronavirus purana, TCoV, uzrokuje akutnu bolest pod nazivom koronavirusni enteritis purana. Porodica *Coronaviridae* uključuje dvije potporodice, *Coronavirinae* i *Torovirinae*. Potporodica *Coronavirinae* također sadrži i tri roda, *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus* i *Gammacoronavirus*. Genom se sastoji od pozitivno polarizirane jednolančane RNA molekule. Genom virusa ima 27 632 nukleotida. Također postoje i dva otvorena okvira za čitanje, ORF, ORFs 1a i 1b, a nalaze se u prve dvije trećine genoma sa devet dodatnih okvira za čitanje. TCoV se može javiti kod purana bez obzira na starost, ali uzrokuje uginuća uglavnom kod purana u dobi od 1 do 4 tjedna starosti kada smrtnost iznosi od 10 do 50 posto. Istraživanja su pokazala da su purani prirodni domaćini za TCoV, koji uzrokuje oboljenje kod peradi, ali ne i kod pilića. Replikacija virusa se odvija u enterocitima. Uništavanje enterocita dovodi do pojave proljeva, maldigestije, malapsorpcije i smanjenog prirasta. Uzročnik je prisutan u izmetu i crijevima inficiranih ptica pa je i za očekivati da se prenosi feko - oralnim putem. Do izravnog prijenosa dolazi prilikom kontakta sa bolesnim pticama, a neizravni prijenos se odvija putem radnika ili kontaminirane opreme. Virusni antigen je moguće dokazati u paranazalnom sinusu i suznoj žlijezdi inficirane peradi i 14 dana nakon infekcije. Do infekcije uglavnom dolazi u ljetnim mjesecima sa sporadičnim pojavama u jesen. Virus je relativno otporan u vanjskoj sredini i lako se prenosi između farmi peradi. Bolesne životinje se skupljaju u grupe, perje je nakostriješeno, smanjen je unos hrane i vode, prisutan je proljev, gubitak na težini i zaostajanje u rastu. Navedeni znakovi bolesti mogu potrajati i do dva tjedna, a oporavak može potrajati i nekoliko tjedana. TCoV može sinergijski djelovati i sa drugim patogenima čime se pogoršava slika bolesti. Na to ukazuje podatak da životinje kojima je inokuliran samo TCoV su razvile samo umjerenu depresiju rasta bez uginuća, dok kod životinja kod kojih je uz TCoV inokulirana i *E. coli* su pokazale povećanu stopu mortaliteta i depresiju rasta. Crijeva bolesnih

životinja su znatno povećana i ispunjena kašastim sadržajem, dok su stijenke crijeva mlitave i blijede. Osim promjena na crijevima uočava se atrofija gušterače, Fabricijeve burze, slezene, dilatirani žučni mjehur i ureteri. Ovisno o težini infekcije opaža se blagi multifokalni do teški enteritis sa atrofijom crijevnih resica. Dolazi do nabiranja epitelnih stanica sa infiltracijom limfocita i heterofila u lamini propriji crijevnih resica. U postavljanju dijagnoze pomaže izolacija virusa, elektronska mikroskopija, otkrivanje virusne RNA i serološke pretrage. Virus se može uzgajati u kokošnjim ili purećim zamecima jer se teško uzgaja na kulturama stanica. Osim navedenih pretraga za dijagnostičke svrhe se koristi i ELISA. Na tržištu su također dostupni različiti molekularni testovi za otkrivanje i razlikovanje TCoV-a od drugih virusa. Protiv ovog patogena još uvijek nema razvijenog cjepiva kao niti specifične terapije. Još uvijek jedini način borbe protiv TCoV-a su ispravne biosigurnosne mjere, pravilno zbrinjavanje uginulih životinja te provedba mjera dezinfekcije. Uz navedene načine, smanjenje vlage, upotreba antibiotika u borbi protiv sekundarnih bakterijskih infekcija i poboljšanje higijene mogu smanjiti štetno djelovanje uzročnika. (JINDAL i sur, 2014.).

2.1 Reovirus

Ptičji *Reovirus* je prvi puta izoliran kod ptica koje pate od kronične respiratorne bolesti (CRD), te je kao takav imenovan kao Fahey - Crawley antigen. Reovirusi su također izolirani kod životinja koje boluju od artritisa i tenosinovitisa i nazvani su TARV (turkey arthritis reovirus). Mogu se podijeliti u dvije skupine, a to su fuzogeni i nefuzogeni. Pripadnici fuzogene skupine imaju sposobnost izazivanja fuzije stanica, dok nefuzogeni nemaju tu sposobnost. Nefuzogeni reovirusi se uglavnom pojavljuju kod sisavaca za razliku od fuzogenih koji su prisutni i kod gmazova i ptica. Reovirusi pripadaju rodu *Orthoreovirus* i porodici *Orthoreoviridae*, a veličina im varira od 70 do 80 nm. Virusi sadrže dvolančani RNA genom koji se sastoji od deset segmenata, koji su podijeljeni u tri klase (L,M i S) ovisno o njihovoj veličini i brzini kretanja pri elektroforezi u poliakrilamidnom gelu. Genom reovirusa ima dvanaest otvorenih okvira čitanja, koji kodiraju osam strukturnih i četiri nestrukturna proteina. Nestrukturni proteini za razliku od strukturnih nisu prisutni u zreom virionu i eksprimiraju se samo u zaraženim stanicama. Rezultati analize sekvenci različitih gena su pokazali da se pureći reovirusi razlikuju od onih pilećeg podrijetla. Istraživanja su pokazala da TRV čine zasebnu skupinu u odnosu na kokošje i druge izolate ptičjeg reovirusa. Na temelju toga bi se TRV potencijalno mogli smatrati zasebnom skupinom unutar roda *Orthoreovirus*. Ove

rezultate dodatno potkrjepljuju istraživanja u kojima TRV nisu mogli stvoriti znakove bolesti kod pilića, bez obzira što se mogu replicirati u njihovom crijevnom sustavu. Isto tako visoko patogeni soj reovirusa koji izaziva oboljenje kod pilića, nije izazvao izrazite kliničke znakove kod purana. Relativno veliki postotak (85-90%) izolata reovirusa su nepatogeni sojevi. Patogeni sojevi su povezani sa različitim oboljenjima kao što su PEC, LTS, miokarditis, tenosinovitis, artritis. Enteritis koji nastaje kao posljedica reovirusne infekcije se uglavnom javlja kod mlađih kategorija peradi, u dobi od prvog do sedmog tjedna starosti, a učestalost infekcije se smanjuje s dobi. Reovirusi su također otkriveni i kod klinički zdravih ptica. U istraživanju, na pet zdravih jata, 10,4% od 193 uzorka su se pokazala pozitivnima na prisustvo ovog virusa. Najčešći je horizontalni način prijenosa, feko - oralnim putem, ali je zbog stabilnosti virusa u vanjskim uvjetima moguć i mehanički prijenos. Pretpostavlja se da je moguć i vertikalni prijenos, ali to još uvijek nije dokazano. Najčešći simptomi su vodenast i pjenušav proljev, depresija, razbarušeno perje, gubitak težine i povećana smrtnost. Zbog djelovanja virusa se mogu stvoriti pogodni uvjeti za razvoj bakterija, stoga su česte sekundarne bakterijske infekcije, a osim toga mogu sinergijski djelovati i sa drugim patogenima. Na crijevima se uočava hiperplazija kripti zbog infiltracije limfocita, heterofila i eozinofila u lamini propriji i submukozi od 11 do 14 dana nakon infekcije. Osim promjena na crijevima se može zamijetiti i atrofija Fabricijeve burze. Proljev koji je prisutan u jatu, jasan je pokazatelj crijevne infekcije, ali za dijagnozu su potrebni laboratorijski testovi. Elektronskom mikroskopijom je moguće otkriti prisutnost uzročnika. Virus dobro raste u kokošnjem zametku, a osim toga je izoliran iz stanica jetre i bubrega kokošnjeg zametka. Zbog sposobnosti fuzije se uočava citopatogeni učinak virusa nakon inokulacije u stanične kulture. Na tržištu su dostupni ELISA kitovi za otkrivanje protutijela kokošnjeg reovirusa, ali takvi još nisu dostupni na tržištu za detekciju puranskog reovirusa. Za sada je još uvijek RT-PCR najosjetljiviji i najspecifičniji test koji se koristi u dijagnostici ovih virusa. Kao i kod koronavirusa, nema specifične terapije koja pomaže prilikom reovirusnih infekcija. Virus je ubikvitaran i jako stabilan u prirodi, zbog čega ga je jako teško iskorijeniti iz farmi i jata nakon što jednom dođe do infekcije. Još uvijek za ovaj patogen ne postoji cjepivo pa su biosigurnosne mjere najvažniji način obrane. (JINDAL i sur, 2014.).

2.2 Rotavirusi

Rotavirusi su važni patogeni koji uzrokuju proljev, kako kod novorođenčadi tako i kod širokog spektra životinja. Virus je prisutan i kod brojlera kod kojih uzrokuje sindrom kržljivosti. Pripadnici su roda *Rotavirus* i porodice *Rotaviridae*. Sadrže 11 segmenata dvolančane RNA koja je okružena trostrukim slojem proteinske kapside. Svaki od tih segmenata kodira barem jedan protein. Vanjski sloj proteina sadrži dva neutralizirajuća antigena: virusni protein 4 (VP4) i virusni protein 7 (VP7). Virusni protein 6 (VP6) drugog sloja kapside se naziva antigen grupe i to je antigen koji se koristi za detekciju i klasifikaciju rotavirusa. Ovisno o antigenim svojstvima virusnog proteina 6, rotavirusi su podijeljeni na pet seroloških vrsta (A-E) i na dvije dodatne vrste (F i G) koje se također nazivaju rotavirusnim skupinama. Utvrđeno je da prve tri skupine zaražavaju uglavnom ljude i životinje, dok skupine D, E, F i G većinom zaražavaju ptice. Glavni problem klasifikacije rotavirusa na temelju migracije profila RNA nastaje zbog mogućeg preuređenja genoma. Za razliku od skupine A, koja ima veći tropizam prema duodenalnim stanicama, skupina D ima veću sklonost prema jejunumu i ileumu. Kao i drugi patogeni, tako i rotavirusi koji se javljaju kod purana se razlikuju od onih rotavirusa koji izazivaju oboljenja pilića. Rotavirusi su rasprostranjeni svugdje po svijetu, a izolirani su iz klinički zdrave peradi i one peradi koja je oboljela od enteritisa. Istraživanjem na 33 jata purana i na 43 jata tovnih pilića, rotavirusi su dokazani u 46 % jata purana, a kod tovnih pilića u 70 % jata. Drugo istraživanje je pokazalo da 93 % jata pogođenih PEMS-om je pozitivno na rotavirus. Pojavnost virusa je puno veća kod mlađih kategorija, te se smanjuje postepeno sa dobi životinja. Prilikom nadzora PES-a i LTS-a, jako velik postotak peradi je bio inficiran rotavirusom u dobi od 2 do 5 tjedana, nakon čega je uslijedio pad broja zaraženih ptica u dobi od 8 do 9 tjedana. U istraživanju koje je provedeno u Europi, rotavirusi su identificirani pomoću dvije različite metode, elektroforeze u poliakrilamidnom gelu s klasičnim RT-PCR i qPCR testovima specifičnih za skupine A i D. Najznačajniji način prijenosa je feko - oralnim putem, ali zbog dobre otpornosti virusa na utjecaje iz okoliša moguć je i mehanički prijenos. Sumnja se da u obzir dolazi i vertikalni prijenos, ali ta mogućnost još nije znanstveno dokazana. Također je opisan i međuvrsni prijenos virusa. U jednom istraživanju, rotavirusi goveđeg podrijetla, skupine A su otkriveni u crijevnom sadržaju purana. Ptičji rotavirusi nisu dokazani kod ljudi, ali je otkriveno da ljudski rotavirusi sadrže sekvence

ptičjih rotavirusa što ukazuje na malu vjerojatnost infekcije ljudi ptičjim rotavirusima. Najizraženiji simptomi infekcije ovim virusima su potištenost, depresija, vodeni proljev, gubitak težine te pad nesivosti. Mortalitet može, ali i ne mora biti prisutan, dok je morbiditet varijabilan. U mnogim slučajevima se opaža pjenušavi i vodenasti crijevni sadržaj. Primjećuje se bljedilo crijevnog trakta i rastezanje slijepog crijeva pjenušavim ili nepjenušavim crijevnim sadržajem. Prisutne su i multifokalne, površinske erozije u dvanaesniku i jejunumu, a mikroskopske promjene uključuju hipercelularnost lamine proprije zbog infiltracije eozinofila, heterofila i mononuklearnih stanica te atrofije crijevnih resica. Elektronskom mikroskopijom se uočava hrapava površina resica te gubitak mikrovila smještenih na vrhovima resica. Na temelju kliničkih znakova se može posumnjati na infekciju probavnog sustava, ali se elektronskom mikroskopijom crijevnog sadržaja može otkriti prisustvo čestica veličine od 50 do 70 nm, prepoznatljivog izgleda kotača, čime ćemo potvrditi sumnju na infekciju rotavirusima. Najjednostavniji način dijagnostike rotavirusa u purana je test koaglutinacije, koji se pokazao kao relativno jednostavan i brz. Za detekciju virusa je dostupno nekoliko RT-PCR i qPCR dijagnostičkih metoda koji ciljaju na različite segmente genoma. Zabilježena je izrazito osjetljiva i specifična qPCR metoda koja cilja nestrukturani protein 4 (NSP4). Kao i kod virusa spomenutih do sada ne postoji specifičan način prevencije protiv rotavirusa. Ključ su dobre biosigurnosne mjere te nabavljanje pilića i purića iz zdravih uzgoja (JINDAL i sur, 2014.).

2.3. Astrovirusi

Astrovirusi su prvi puta otkriveni 2008. godine kod djece, a potom su izolirani iz fecesa brojnih životinjskih vrsta kao što su mačke, psi, jeleni, goveda, svinje, ovce, pure, pilići, patke i dr. To su virusi s jednolančanom RNA molekulom, obavijeni čvrstom kapsidom, veličine 25 - 35 nm, koji pripadaju porodici *Astroviridae*. Porodica je podijeljena u dva roda *Mamastrovirus* (MAstVs) i *Avastrovirus* (AAstVs). Virusi koji pripadaju rodu MAstVs izazivaju oboljenja kod sisavaca, dok pripadnici roda AAstVs zaražavaju ptice. Otkrićima sve većeg broja astrovirusa sisavaca i ptica se uvode brojne taksonomske promjene. Zbog te činjenice rodovi MAstVs i AAstVs se mogu podijeliti u 6, odnosno 7 vrsta, što je pokazatelj genske raznolikosti porodice sa širokim spektrom domaćina. Unutar vrsta, virusi se klasificiraju u serotipove na temelju dvostrukog ili višestrukog dvosmjernog unakrsnog neutralizacijskog titra. Zbog teškog uzgoja na kulturama stanica ili životinjskim modelima te snažne korelacije između genotipova i serotipova, serološka

klasifikacija se pretpostavlja na temelju postotka sličnosti sekvence kapsida. Ime su dobili prema svom karakterističnom izgledu jer sadrže glatku ili blago uvučenu vanjsku elektronski gustu ovojnicu sa peterokrakom ili šesterokrakom jezgrom. Zajedno sa norovirusima i ostalim uzročnicima gastroenteritisa bili su uključeni u skupinu malih okruglo strukturiranih virusa (engl. SRSV). Kod sisavaca astrovirusi uzrokuju u većini slučajeva proljev kod mlađih životinja ili asimptomatske infekcije, dok kod ptica uzrokuju proljev, hepatitis ili u nekim slučajevima nefritis. Na žalost, nedavna istraživanja su otkrila da astrovirusi kod ljudi mogu postati sistemski i izazvati puno gore znakove bolesti osim proljeva (GUIX i sur, 2013.). U ptica kao domaćina, astrovirusi su povezani sa PEMS-om kod mlađih kategorija, lezijama bubrega, nefritisom, sindromom kržljivosti te hepatitisom. Astrovirusi purana (TAsTVs) su široko rasprostranjeni patogeni. U početku su se smatrali kao dva serotipa istog virusa, ali su TAsTVs-1 i TAsTVs-2 zapravo genetski nepovezani, te je TAsTVs-2 značajno rasprostranjeniji i raznolikiji. Zanimljivo je da je zabilježena rekombinacija između TAsTVs-a koja cirkulira u jatima purana. Genotip AAstV-3 sadrži astroviruse koji inficiraju zamorčiče, a koji su usko povezani sa TAsTVs - 2. Na temelju toga, međuvrni prijenos između purana i zamorčiča je predložen kao mogući mehanizam kojim su se ovi virusi razvili. Također astrovirusi povezani sa hepatitisom kod pataka su također sadržani u genotipu AAstVs - 3, što ukazuje na mogući prijenos astrovirusa sa purana na patke. Jedan od brojnih virusa koji je rasprostranjen kod pilića i purana je ANV (Avian nephritis virus), koji odgovara genotipu AAstVs - 2, a zabilježena su najmanje dva serotipa. Bez obzira na to, filogenetska analiza je pokazala da unatoč infekciji istog domaćina sa ANV, pileći astrovirusi su puno strodniji TAsTVs - 1 i TAsTVs - 2 nego ANV (GUIX i sur, 2013.). Kao i većina ostalih virusa, astrovirusi također uzrokuju proljev, dehidraciju, smanjeno uzimane hrane i vode te smanjen prirast. Slični simptomi su zabilježeni i kod peradi kojima je eksperimentalno inokuliran materijal koji sadrži TAsTVs. Istraživanja su pokazala da je TAsTVS - 2 bio mnogo patogeniji kod onih ptica koje su već prije bile pogođene PEMS - om, što ukazuje na sinergističko djelovanje uzročnika. Također će i *Astrovirus* smanjiti obrambenu sposobnost imunološkog sustava životinja, čime se povećava izloženost drugim uzročnicima. Patoanatomski nalaz uključuje dehidraciju, dilatirana crijeva koja su ispunjena neprobavljenom hranom, vodenim i pjenušavim sadržajem. Kao histološki nalaz prisutna može biti i blaga do umjerena atrofija burze Fabricii, nekroza epitela, infiltracija lamine proprije i hiperplazija kriпти. Za dijagnozu nisu dovoljni samo klinički znakovi koji će upućivati na infekciju probavnog sustava. Pomoću elektronske mikroskopije mogu se

ustanoviti virusi koji na svojoj površini imaju pet ili šest izbočina koje nalikuju zvijezdi, no te strukture se prilikom svakog pregleda ne razaznaju jednako jasno. Zbog toga je moguća zamjena astrovirusa sa pikornavirusima, enterovirusima i drugim sličnim uzročnicima. Ponekad kod mlađih kategorija peradi do kliničkih znakova i patoloških promjena dolazi u kasnijoj fazi infekcije dok u crijevnom sadržaju nisu prisutni virusi, što će uzrokovati negativni nalaz pretrage. Molekularne pretrage se koriste za otkrivanje i daljnju karakterizaciju astrovirusa, te se većina testova temelji na RT-PCR-u i koristi početnice specifične za kapsidni ili polimerazni gen TAsVs - a (JINDAL i sur, 2014.).

2.4. Metagenomika

Sekvenciranje slijedeće generacije je nova metoda koja pomaže u brojnim istraživanjima u veterinarskoj i humanoj medicini. Metagenomska analiza je omogućila otkrivanje novih patogena i identifikaciju novih uzročnika bolesti. Ove metode su korištene u brojnim istraživanjima u kojima je pojašnjena etiologija crijevnih bolesti. Crijevna flora domaćih životinja ima značajan utjecaj na prirast i na konverziju hrane, no zbog razlika između životinjskih vrsta, postoji jako malo podataka o fiziološkoj ili flori bolesnog stanja. Identifikacija virusa metagenomskim istraživanjima je u današnje vrijeme jedna od najkorištenijih metoda. Iako su neki od patogena identificirani kao uzročnici proljeva, u brojnim slučajevima često korištene dijagnostičke metode su se pokazale nekorisnima. Upravo zbog toga nam sveobuhvatne molekularne metode mogu pomoći u istraživanju novih vrsta, rodova i porodica uzročnika. U jednom od istraživanja uzorci crijeva su prikupljeni na farmama na kojima je već prije zabilježena pojava crijevnih bolesti. Sekvenciranje nukleinskih kiselina visoke propusnosti izvedeno je s GS-FLX titan pirosekvencerom. Autori su uspješno identificirali sekvence koje pokazuju homolognost članova porodica. Mali, okrugli virusi su prethodno otkriveni elektronskom mikroskopijom iako je njihova patogenost ostala nepoznata. Pronađene su sekvence astrovirusa i reovirusa koji pokazuju sličnosti s TAsVs-2. (MIHALOV-KOVACS i sur, 2013.). Rezultati ovog istraživanja mogu pomoći u dizajniranju metagenomskih istraživanja i molekularno dijagnostičkih testova za otkrivanje novih virusa i njihove patogenosti. Iako su za ovu metodu dijagnostičkog alata koji se koristi za otkrivanje novih zaraznih bolesti i virusa potrebna daljnja istraživanja i razvoj, tehnika ima obećavajuću budućnost. Do nedavno su se virusi otkrivali isključivo putem PCR-a ili promatranjem citopatogenih učinaka. Virus koji se teško uzgajaju kao i oni koji nemaju citopatogeni učinak su se teško otkrivali spomenutim

metodama. Istraživanje virusnih metagenoma različitih uzoraka je snažno sredstvo za razvoj veterinarske medicine i može pomoći da razumijemo raznolikost patogena i njihovu evoluciju. Virusna metagenomika se primjenjuje i na divljim životinjama, jer su mnoge od njih rezervoari zaraznih bolesti, koje se lako mogu prenijeti i na domaće životinje i ljude (MIHALOV-KOVACS i sur, 2013.).

Virusne crijevne bolesti predstavljaju ogroman ekonomski teret za peradarsku proizvodnju diljem svijeta. Nacionalna i regionalna istraživanja su uz pomoć molekularnih dijagnostičkih metoda otkrila da virusi neprestano cirkuliraju u populaciji peradi, a mnogi se javljaju i kod zdravih ptica. Pirosekvenciranje nukleinskih kiselina visoke propusnosti moćna je metoda koja ima sposobnost određivanja punog genomskog repertoara koji je prisutan u prirodi. Virusna metagenomika se može koristiti za analizu virusnih sekvenci u gotovo bilo kojoj vrsti uzorka. Također se može koristiti i za određivanje etiologije nepoznatih bolesti i sindroma. Početni ciklusi pirosekvenciranja proizveli su više od 139 000 000 baza nukleotidne sekvence prosječne duljine očitavanja 362 baze. Pojava reovirusa i astrovirusa u je vrlo česta jer su ovi uzročnici jako prošireni u peradi, a nedavna istraživanja su i razjasnila ulogu koju ovi virusi imaju u crijevnim sindromima. Geni ptičjeg reovirusa su otkriveni korištenjem ove metode, ali gen jezgre lambda A, nestrukturani protein muC i strukturalni protein muB nisu prethodno opisani u purana. Ovakav pristup na populaciju virusa koja napada probavni sustav peradi korištenjem metagenomike otkrio je mnogo novih sekvenci RNK virusa (DAY i sur, 2010.)

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Uzorci tkiva korišteni u istraživanju

Na farmama tovnih purana, linije Hybrid, uočene su promjene zdravstvenog stanja u vidu pjenušavog proljeva i povećani mortalitet u prvim tjednima života purića. S obzirom na različite dobavljače jednodnevnih purića ustanovljena je razlika u pojavnosti navedenih simptoma. Na pretragu je dostavljeno 5 do 15 purića porijeklom od 7 različitih jata i različitih dobavljača dobi 3 i 54 dana.. Nakon žrtvovanja, uzeti su skupni uzorci tkiva tankog crijeva od pet jedinki koji su do daljnje analize čuvani na -80 °C.

3.2. Dokaz, karakterizacija virusa metagenomikom primjenom sekvenciranja nove generacije (NGS) te filogenetska analiza

Uzorci tkiva za NGS su se pripremali u nekoliko faza s ciljem koncentracije virusa (HALL i sur., 2014.). Tkiva su podvrgnuta homogenizaciji, otvaranju stanica i centrifugiranju na 13 000 x g tijekom 5 minuta. Supernatant je zatim filtriran primjenom 0,22 µm filtra (MILLIPORE, SAD) kako bi se uklonile bakterije i stanični fragmenti. U sljedećem koraku je filtrat tretiran nukleazama, a virioni su koncentrirani ultracentrifugiranjem na 121 000 x g tijekom 4 sata na 4 °C (UYAGUARI-DIAZ i sur., 2016). Iz uzorka su potom izdvojene nukleinske kiseline automatskom ekstrakcijom primjenom King Fisher Duo Prime uređaja (Thermo Scientific, SAD). Ribosomska RNA (rRNA) je ekstrahirana iz uzoraka primjenom kita Terminator™ 5′-Phosphate-Dependent Exonuclease (LUCIGEN, SAD). Primjenom kita RNA clean and concentrator (ZYMO RESEARCH, SAD) su pročišćeni uzorci, te su potom korišteni za sintezu komplementarne cDNA primjenom kita cDNASynthesis System Kit (ROCHE DIAGNOSTIC GMBH) (LOJKIĆ i sur., 2016). Knjižnica sekvenci je pripremljena primjenom kita Nextera XT DNA (ILUMINA, SAD) te sekvencirana uz pomoć kita MiSeq reagent kit v2 (ILUMINA, SAD) metodom uparenih-krajeva na uređaju Miseq (ILUMINA, SAD). Dobiveni rezultati su analizirani u dva koraka. Korištenjem dva tipa programa na Geneious platformi sirove sekvence su spojene u kontigove. Nakon toga su sirove sekvence i kontigovi klasificirani do stupnja porodice korištenjem Diamond BLASTx programa (BUCHFINK i sur., 2015) mapiranjem prema proteinskoj bazi podataka, dobivenoj na NCBI platformi, ograničenoj na virusne sekvence. Nukleotidne sekvence za identificirane taksone su potom dobivene s NCBI-a. Provedeno je sravnjivanje i filogenetska analiza primjenom računalnog programa Mega7, koristeći Neighbour-joining metodu i bootstrap testiranje s 1000 replikata. Pomoću metode Tamura-3 parametra je izračunata evolucijska distanca.

4. REZULTATI

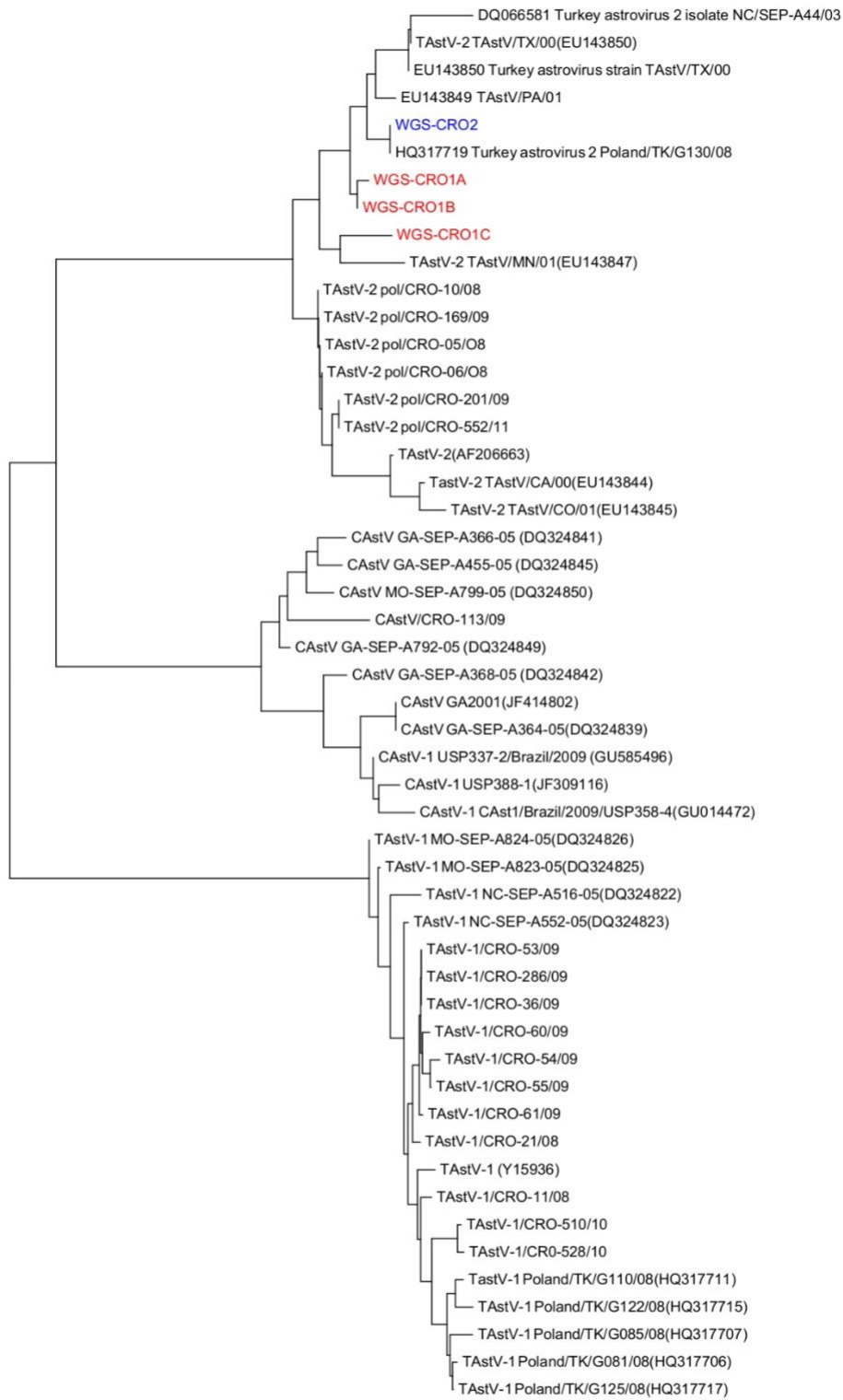
4.1. Metagenomika

U uzorcima tkiva slezene i tankog crijeva je dokazana prisutnost samo astrovirusa, u tri od 7 jata, dok je rotavirus detektiran samo u jednom jatu (Tablica 1). U tri jata nije dokazana prisutnost virusa. Kod jata 2 pozitivnog na astrovirus, praćenog longitudinalno, dokazana je prisutnost virusa do 14. dana, ali i nestajanje virusa nakon 30. dana. Dokazani virusi (WGS-CRO-1A-C i WGS-CRO-2) pokazuje srodnost s virusima s drugih farmi dokazanih u istom ili prethodnim razdobljima na području Hrvatske i Europe, a najveću sličnost pokazuju s virusom podrijetlom iz Poljske (Slika 1). Rezultati pokazuju dosta visoku prevalenciju astrovirusa u puranskim jatima (42,85%), i relativno nisku rotavirusa (14,28 %) (Tablica 1).

Tablica 1. Rezultati po jatima za astro i rotaviruse u istraživanju s pripadajućom dobi

JATO	DOB (dana)	ASTRO	ROTA
1	16	+ WGS CRO1A	-
2	4	+ WGS CRO1B	-
	9	+	-
	14	+ WGS CRO1C	-
	30	-	-
3	3	-	-
4	5	-	-
5	54	-	-
6	5	+	-

		WGS CRO2A	
7	20	-	+
	Σ	3/7 (42,85 %)	1/7 (14,28 %)



Slika 1. Filogenetsko stablo sravnjenih sekvenci puranskih astrovirusa primjenom računalnog programa Mega7 koristeći Neighbour-joining metodu i Bootstrap testiranje s 1000 replikata.

5. RASPRAVA

S obzirom da su vrlo česti problemi od strane probavnog sustava koji se javljaju od samih početaka proizvodnje, svrha ovog rada je bila dokaz patogene virusne etiologije u uzorcima tkiva tankog crijeva sekvenciranjem čitavog genoma. Cilj rada bio je utvrditi etiologiju koja postoji u podlozi enteritisa koji se javljaju u ranoj fazi tova purana. Ustanovljeno je da proteomika i metagenomika mogu značajno pridonijeti u razjašnjavanju patogeneze i interakcije domaćina i patogena (MARQUES i sur.,2019.). Suvremene metode u genomici to ubrzavaju i pojednostavljaju dajući nam jasan uvid u prevalenciju uzročnika ili nekoliko njih iz šume rezultata. Monitoringom jata rezultati metagenomike precizno pokazuju postojanje virusnih patogena u tkivima, kao i njihovu longitudinalnu dinamiku. S obzirom da astrovirusi značajno narušavaju zdravlje, a time i proizvodnju purića, njihov dokaz i praćenje su od velike važnosti u daljnjem postupanju sa zaraženim jatom, kako u smislu simptomatske terapije i opskrbe elektrolitima i lako probavljivim pripravcima u svrhu što bržeg oporavka, tako i u smislu jačanja biosigurnosnih mjera kojima je cilj spriječiti širenje uzročnika na druga prijemljiva jata. Imajući u vidu da je zaraza kod većine životinja u početnom stadiju asimptomatska potrebno je monitoringom ustanoviti postojanje zaraze i procijeniti rizik za njene posljedice (CATOLLI, 2020.). Tim načinima možemo unaprijed reagirati na moguće zaraze. Rezultati monitoringa su pokazali značajno visoku prevalenciju astrovirusa na farmama purana mlađih kategorija i nisku rotavirusa, što je vjerojatni pokazatelj vertikalnog prijenosa i horizontalnog širenja uzročnika ili loših higijenskih uvjeta koji uvelike pridonose nastanku i širenju oboljenja. Upravo vertikalni prijenos predstavlja najveći problem jer je tim načinom prijenosa omogućeno rano štetno djelovanje virusa i izazivanje opsežnih oštećenja na probavnom sustavu, a istovremeno je otežana mogućnost profilakse i uz najstrože biosigurnosne mjere. Upravo longitudinalni monitoring pokazuje prisustvo astrovirusa u dobi do 14 dana i odsustvo astrovirusa u dobi nakon 30 dana starosti i time njegov dobni tropizam k probavnom traktu, što ostavlja trajne posljedice tijekom čitavog proizvodnog ciklusa, a tako zaražene jedinice nikad ne uspiju ispoljiti genetski zadana svojstva rasta. S obzirom da ne postoji učinkoviti pripravak kojim bi se liječile i prevenirale virusne bolesti, važno je naglasiti na bitnu ulogu koju ima pravilna

provedba biosigurnosnih mjera na proizvodnim i roditeljskim farmama peradi. Tim mjerama bi se značajno smanjile mogućnosti horizontalnog i vertikalnog prijenosa virusa. Upravo zbog nedostatka pripravaka koji bi ciljano djelovali na uzročnike važno bi bilo ili pridonijeti eradikaciji astrovirusa ili unaprijediti imunoprofilaksu astroviroze na roditeljskim farmama. Vjerojatno bi primjena autogenih cjepiva od izdvojenih astrovirusa pridonijela poboljšanju zaštite i redukciji vertikalnog širenja. Uz navedeno metagenomika omogućuje, uz precizan dokaz virusa u uzorcima tkiva, i njihova relativnu kvantifikaciju što je bitna informacija prilikom borbe protiv virusnih patogena i praćenja dinamike njihovog širenja. Upravo sinergija metagenomike i klasičnih metoda izdvajanja i dokaza virusa, uz pripremu autogenih cjepiva, omogućila bi brzu i preciznu borbu protiv virusnih patogena kojima je za cilj vertikalno širenje i štetno djelovanje u ranoj dobi. (GOTTSTEIN i sur., neobjavljeno)

6. ZAKLJUČAK

Temeljem analize rezultata može se zaključiti slijedeće:

- Primjenom metagenomike može se precizno detektirati virusne patogene u uzorcima tkiva, kao i njihovu relativnu količinu.
- Longitudinalnim monitoringom pozitivnog jata prisustvo astrovirusa dokazano je do dobi 14 dana, te odsustvo nakon 30 dana.
- Rezultati monitoringa pokazuju relativno visoku prevalenciju astrovirusa u jatima purana rane dobi, i nisku rotavirusa, što ukazuje na vjerojatni vertikalni prijenos i potom horizontalno širenje, ili loše higijenske uvjete koji pogoduju ranoj zarazi i širenju virusa.
- Rezultati ukazuju na potrebu za visokim biosigurnosnim mjerama na tovnim ali i roditeljskim farmama purana kako bi se spriječilo vjerojatno vertikalno širenje, ali ukazuje i na moguću potrebu za imunoprofilaksom astroviroze na roditeljskim farmama.

7. POPIS LITERATURE

1. BUCHFINK, B., XIE, C., HUSON, D.H. (2015): Fast and sensitive protein alignment using diamond. *Nature Methods* 12, 59–60.
2. CATTOLI, G. (2020): *Astrovirus Infections Diseases of Poultry*. U: *Diseases of Poultry* 14th ed. (Ur. SWAYNE, D.E, M.BOULIANNE, M.,LOGUE, L.R., C.M.,MCDUGLAND, V.,NAIR & D.L.SUAREZ), Wiley-Blackwell, Hoboken,NY, SAD, 416-420.
3. DAY M., BALLARD L., DUKE M., SCHEFFLER B., ZSAK L. (2010.): Metagenomic analysis of the turkey gut RNA virus community
4. GUIX, S., BOSCH, A., PINTO, M. (2013): *Astrovirus Taxonomy*
5. HALL, R.J., WANG, J., TODD, A.K., BISSIELO, A.B, YEN, S., STRYDOM, H., MOORE, N.E., REN, X., HUANG, Q.S., CARTER, P.E., PEACEY, M.(2014.): Evaluation of rapid and simple techniques for the enrichment of viruses prior to metagenomic virus discovery. *Journal of Virological Methods* 195, 194-204.
6. KOVACS, E., FEHER, E., MARTELLA, V., BANYAI, K., FARKAS, L. (2013.): The fecal virome of domesticated animals
7. LOJKIĆ, I., BIĐIN, M., PRPIĆ, J., ŠIMIĆ, I., KREŠIĆ, N., BEDEKOVIĆ, T. (2016.): Faecal virome of red foxes from periur banareas. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 45, 10-15
8. MARQUES, A.T., ANJO, S.I., BHIDE, M., VARELA COELHO, A., MANADAS, B., LECCHI, C., GRILLI, G., CECILIANI, F.(2019): Changes in the intestinal mucosal proteome of turkeys (*Meleagris gallopavo*) infected with haemorrhagic enteritis virus, *Veterinary Immunology and Immunopathology* <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2019.06.001>
9. N. JINDAL, S.K.MOR,S.M.GOYAL, (2014).: Enteric viruses in turkey enteritis
10. UYAGUARI – DIAZ, M.I., CHAN, M., CHABAN, B.L., CROXEN, M.A., FINKE, J.F.,HILL, J.E., PEABODY, M.A., VAN ROSSUM, T., SUTTLE, C.A., BRINKMAN, F.S.L., ISAAC-RENTON, J., PRYSTAJECKY, N.A., TANG, P. (2016): A comprehensive method for amplicon-based and metagenomic characterization of viruses, bacteria, and eukaryotes in fresh water samples. *Microbiome* 27, 31–36.

8. SAŽETAK

Dokaz i tipizacija uzročnika virusne etiologije u probavnom traktu purana primjenom metode sekvenciranja čitavog genoma

Lucija Klarić

Tov purana je jedan od najosjetljivijih oblika peradarske proizvodnje. Problemi od strane probavnog sustava su jedni od najčešćih te se javljaju od samih početaka proizvodnje. Najčešći uzročnici su oni virusne etiologije, često u vidu kompleksa, poput PEMS – a, koji mogu uzrokovati značajne gubitke samostalno ili kao posljedica sekundarnih bakterijskih i parazitarne infekcija. Uzročnici kao što su astrovirusi, rotavirusi, reovirusi, adenovirusi i drugi, su jedni od najčešće izdvojenih patogena iz probavnog sustava. Problem predstavlja vertikalni prijenos, horizontalno širenje te loši higijenski uvjeti koji se teško suzbijaju i preveniraju biosigurnosnim mjerama, koje su često jedini način borbe protiv ranije spomenutih uzročnika. U ovom istraživanju su na pretragu dostavljeno purici porijeklom od 7 različitih jata i različitih dobavljača, dobi 3 i 54 dana. Nakon žrtvovanja, uzeti su skupni uzorci tkiva tankog crijeva od pet jedinki koji su do daljnje analize čuvani na -80 °C. Nakon homogenizacije i centrifugiranja tkiva filtriran je supernatant koji je tretiran nukleazama, a iz pročišćenih viriona su izdvojene nukleinske kiseline iz kojih je uklonjena ribosomska RNA. Uzorci su pročišćeni i korišteni za sintezu komplementarne cDNA koja je sekvencirana uređajem MiSeq (Illumina). Pomoću dva tipa programa na Geneious platformi su sirove sekvence spojene u kontigove te su nakon toga sekvencirani virusi klasificirani do stupnja porodice, nakon čega je provedeno sravnjivanje i filogenetska analiza. U uzorcima je dokazana prisutnost samo astrovirusa u 3 od 7 jata dok je rotavirus dokazan samo u jednom jatu. Longitudinalnim monitoringom pozitivnog jata dokazano je prisustvo astrovirusa u dobi do 14 dana i odsustvo nakon 30. dana starosti. Dokazani virusa pokazuju najveću sličnost sa virusom podrijetlom iz Poljske. Rezultati su pokazali na ranu visoku prevalenciju astrovirusa i relativno nisku prevalenciju rotavirusa, čime ukazuju na potrebu poboljšanja higijenskih uvjeta i biosigurnosnih mjera na farmi, kao i mogućeg poboljšanja imunoprofilakse na roditeljskim farmama čime bi se smanjio vertikalni pritisak na proizvodna tovna jata.

9. SUMMARY

Evidence and typification of pathogens of viral etiology in the digestive tract of turkeys using the whole genome sequencing method

Turkey fattening is one of the most sensitive forms of poultry production. Problems with the digestive system are one of the most common and occur from the very beginning of production. The most common causes are those of viral etiology, often in the form of complexes, such as PEMS, which can cause significant losses on their own or as a result of secondary bacterial and parasitic infections.

Causes such as astroviruses, rotaviruses, reoviruses, adenoviruses and others are among the most commonly isolated pathogens from the digestive system. The most common problems are vertical transmission, horizontal spreading and poor hygiene conditions that are difficult to control and prevent with biosecurity measures, which are often the only way to combat the previously mentioned pathogens. In this study, turkeys from 7 different flocks and different suppliers, aged 3 and 54 days, were submitted for search. After sacrifice, aggregate small intestinal tissue samples of five individuals were taken and stored at -80 °C until further analysis. After homogenization and centrifugation of the tissue, the supernatant was filtered and treated with nucleases, and nucleic acids were extracted from the purified virions from which the ribosomal RNA was removed. Samples were purified and used for the synthesis of complementary cDNA sequenced by the MiSeq (Illumina) device. Using two types of programs on the Geneious platform, the raw sequences were joined into contigs, after which the sequenced viruses were classified to the family level, after which comparison and phylogenetic analysis were performed. The presence of astrovirus alone was detected in the samples in 3 of 7 flocks while rotavirus was detected in only one flock. Longitudinal monitoring of the positive flock proved the presence of astrovirus up to 14 days of age and absence after 30 days of age. Proven viruses show the greatest similarity with the virus originating from Poland. The results showed an early high prevalence of astrovirus and a relatively low prevalence of rotavirus, indicating the need to improve hygiene conditions and biosecurity measures on the farm, as well as a possible improvement in immunoprophylaxis on parent farms to reduce vertical pressure on production flocks.

10. ŽIVOTOPIS

Lucija Klarić rođena je 18. listopada 1995. godine u Splitu. Osnovnu školu završila je u Čaporicama (Područna škola) i Trilju (Osnovna škola) s odličnim uspjehom. 2014. godine završava srednju školu Braća Radić u Kaštel Štafiliću, smjer veterinarski tehničar, također sa odličnim uspjehom. 2015. godine upisuje Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, te je tijekom studija radila razne studentske poslove u struci (Purex d.o.o.) i izvan nje. Također, aktivno sudjeluje kao član i voditelj nogometne ekipe fakulteta. Isto tako, bavila se nogometom i izvan fakulteta u nekoliko futsal ekipa u Zagrebu.