

Mink astrovirus – preliminary observations

Gliński Z., Kostro K., Faculty of Veterinary Medicine, University of Life Sciences in Lublin

The aim of this paper was to present introductory notes on astrovirus in minks. Astroviruses (AsVs) are small, single-stranded RNA (6.8–7.9 kb, three ORF) viruses, first identified in children suffering from diarrhea in 1975. Then astroviruses were identified in domestic, synantropic and wild mammals and also in avian species. Their association with enteric diseases is documented in children and in minks as shaking mink syndrome (SMS) and preweaning mink diarrhea (PMD). Phylogenetic analysis demonstrated that mink astrovirus VA1 (AstV-VA1), is highly divergent from all previously described astroviruses. The characteristic clinical signs of SMS include shaking, staggering gait, and ataxia. In pre-weaning syndrome dominates diarrhea and excessive secretion from cervical apocrine glands in young mink kits. Mink farmers refer to this syndrome as “sticky”, “greasy”, or “wet” kits. A species-specific RT-PCR for mink astrovirus genome is suitable for the diagnosis of both SMS and PMD.

Keywords: mink astrovirus, shaking mink syndrome, preweaning mink diarrhea.

Astrowiroza norek – obserwacje wstępne

Zdzisław Gliński, Krzysztof Kostro

z Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UP w Lublinie

Naukowcy napotykają coraz większe trudności w badaniach nad odkrywaniem przyczyn nowych chorób. W przypadku chorób wirusowych dotychczas stosowane techniki badawcze najczęściej zawodzą. Odnosi się to zarówno do metod izolacji wirusów na hodowlach komórkowych, jak i technik molekularnych wykorzystujących PCR i jej odmiany. Dopiero wprowadzenie nowych, bardziej precyzyjnych sposobów identyfikacji kwasów nukleinowych zarówno DNA, jak RNA często przynosi efekty (1). Osiągnięcia metagenomiki z ostatnich lat umożliwiają bowiem wykrycie DNA i RNA wirusowego w materiale biologicznym różnego rodzaju pochodzącym od ludzi i zwierząt (2, 3). Opierają się one m.in. na wykorzystaniu losowej amplifikacji i sekwencjonowaniu kwasów nukleinowych lub różnych chipów mikro-

chips). Technika 454, Solid i Solexa umożliwiły wykrycie nowych wirusów (4, 5).

Dzięki tym nowym technikom zidentyfikowano astrowirusy wywołujące zakażenia u ludzi i zwierząt. Choroby zakaźne norek wywołane przez astrowirusy są słabo poznane, stąd też wiele zagadnień związanych z ich występowaniem i patogenезą nie zostało wyjaśnionych i wymaga dalszych szczegółowych badań przeprowadzonych na większym materiale. Dotychczas wyjaśniono rolę astrowirusów wywołujących u dzieci biegunkę (2) oraz zapalenie mózgu u chłopca z immunosupresją (6). Astrowirus norek (mink astrovirus type 1 – MAstV-1) atakuje norcztęta i jest przyczyną dotychczas wyróżnionych trzech zespołów chorobowych: zespołu drżących norcztęta (shaking mink syndrome – SMS), przedodsadzeniowej biegunki norek (preweaning mink diarrhoea

– PMD) i zespołu mokrych norcząt (wet mink syndrome – WMS, greasy mink syndrome – GMS; 4, 7). Istnieje też pogląd, że PMD i WMS stanowią jeden zespół chorobowy nazwany PMD, a nadmierna aktywność gruczołów apokrynowych jest jednym z jego objawów (6).

W zespole drżących norcząt (SMS) na czoło objawów klinicznych wysuwają się zaburzenia neurologiczne w postaci drżenia, napadów drgawek, ataksji i chwiejnego chodu. Są one związane z limfocytarno-plazmocytnym zapaleniem mózgu i opon mózgowych. Identyczne objawy i zmiany, jak w zakażeniach naturalnych występują u norek zakażonych doświadczalnie homogenatem mózgu chorych zwierząt, co świadczy o tym, że ośrodkowy układ nerwowy jest docelowym narządem ataku wirusa.

Epidemiologia

Pierwsze zachorowania norek, wśród objawów neurologicznych określonych później jako zespół drżących norcząt (SMS), wystąpiły w fermie norek w USA w 1985 r. (8), następnie chorobę stwierdzono u norek z fermy hodowlanej w Danii w 2000 r. W 2001 r. choroba o identycznych objawach wystąpiła w Szwecji i Finlandii (9). Astrowirus norek (MAstV-1) stwierdzono w mózgu chorych norek oraz wykazano jego obecność w mózgu 3 norek po doświadczalnym zakażeniu homogenatem mózgu chorych norek, nie stwierdzono go natomiast u norek zakażonych homogenatem mózgu zdrowych norek. Izolat wykazywał 80,5% identyczności z regionem kodującym astrowirus przedosadzeniowej biegunki norek i 52,3% (6, 10) z astrowirusem pochodzącym od chłopca z zapaleniem mózgu związanym z immunosupresją (HAstV-PS; 11). Dla regionów kodujących białka niestrukturalne identyczność sekwencji w przypadku astrowirusa przedosadzeniowej biegunki norek wynosiła około 90%, a dla regionu kodującego białko strukturalne tylko 67%.

Przyczyną przedosadzeniowej biegunki i nadmiernej produkcji wydzieliny gruczołów apokrynowych okolicy szyjnej ssących norek w zespole „mokrych” (wet), „pokrytych tłuszczem” (greasy) lub „lepkich” (sticky) norek (WMS) jest zakażenie astrowirusowe. Astrowirus występuje w kale chorych zwierząt. Oprócz astrowirusów czynnikiem ryzyka, ale mniejszego stopnia, są ziarniaki cechujące się adhezją do kosmków jelitowych i kaliciwirusy (6).

Astrowirusy po raz pierwszy zidentyfikowano w mikroskopie elektronowym w kale dziecka chorego na biegunkę w Szkocji w 1975 r. (12). Następnie okazało się, że astrowirusy występują

u 22 gatunków zwierząt, zarówno dzikich, jak i udomowionych, u ptaków, ssaków wodnych (lew morski) i lądowych (13). U ludzi astrowirusy są patogenami przewodu pokarmowego, wywołując zapalenie żołądka i jelit, natomiast u kur są przyczyną zapalenia nerek (avian nephritis; 14, 15), a u norek wymienionych poprzednio trzech zespołów chorobowych. U norek astrowirus wywołuje astrowirus norek (MAstV-1; 16, 17).

Właściwości astrowirusa norek

Kubiczny kapsyd astrowirusa (*Astroviridae*) o średnicy 28–30 nm jest pozbawiony otoczki, genom stanowi jednoniciowy RNA o polaryzacji dodatniej (6,8–7,9 kb, trzy otwarte ramki odczytu: ORF1a, 1b i 2). Wirus replikuje się w cytoplazmie zakażonych komórek. W rodzinie *Astroviridae* wyróżniono dwa rodzaje: *Mamastrovirus*, do którego zalicza się astrowirusy ssaków (ludzie, kozy, bydło, świnie i dziki, sarny, nietoperze, lwy morskie) i *Avastrovirus*, do którego należą astrowirusy ptaków. W obrębie każdego rodzaju wyróżniono gatunki w zależności od gatunku atakowanych zwierząt oraz serotypy (18). Astrowirusy cechują się dużą częstością mutacji ($3,7 \times 10^{-3}$ / nukleotyd/rok) oraz dużymi zdolnościami rekombinacyjnymi, co jest przyczyną ich zmienności genetycznej, adaptacji do nowych gospodarzy, a także zoonotycznego charakteru niektórych astrowirusów (17). Astrowirusy są inaktywowane w 50–60°C przez 30 min, stabilne w niskich temperaturach, niewrażliwe na chloroform i eter. Giną pod wpływem większości środków odkażających (związki chloru, aldehyd glutarowy).

Patogeneza zakażenia astrowirusem norek jest podobna, jak i w innych zakażeniach wirusowych, w których atakowany jest układ nerwowy. Po przeniknięciu przez nabłonek i wstępnej replikacji wiriony przedostają się do krwi i chłonki, a za ich pośrednictwem do narządu docelowego, jakim jest ośrodkowy układ nerwowy. Komórki zakażają się wirusem na drodze endocytozy, zaś efektem końcowym działania wirusa jest apoptoza zakażonych komórek.

Objawy kliniczne zespołu drżących norcząt (SMS)

Choroba dotyczy zwykle tylko pewnej liczby ferm, niezależnie od hodowanej odmiany norek. Obserwacje wskazują na małą zjadliwość wirusa. Charakterystycznym objawem u chorych zwierząt są drgawki ciała, a ponadto przeraźliwe piski, ślinotok, chwiejny chód, częste leżenie oraz ataksja. Bezwładne, niezamierzone ruchy

głowy i ciała utrudniają pobieranie karmy i wody. W miarę postępu choroby objawy są coraz bardziej zaawansowane. Często chore osobniki obracają się wokół osi długiej ciała. Zwierzęta szybko tracą na wadze na skutek niezamierzonego zaburzenia pobierania karmy. Nie wiadomo przy tym, czy chore zwierzęta nie są dotknięte ślepotą. Pod koniec choroby zwierzęta leżą i występuje nadwrażliwość na dźwięki. Wiele chorych osobników przeżywa, gdy ma możliwość pobierania karmy i picia. U części z nich cofają się objawy neurologiczne. Objawy występujące w SMS bardzo przypominają objawy występujące w młodzieńczej encefalopatii norek. Jedyne wyjątkiem dotyczy występowania choroby, ponieważ w młodzieńczej encefalopatii chorują wyłącznie brązowe norki. Wyraźne różnice pomiędzy obydwoma chorobami występują w obrazie histopatologicznym ośrodkowego układu nerwowego.

Zmiany anatomopatologiczne

Brak zmian makroskopowych. Zmiany zapalne widoczne są w badaniu histopatologicznym mózgu wszystkich chorych osobników i cechują się różnym nasileniem. W łagodnej postaci choroby obejmują one najczęściej doogonową część pnia mózgu, most i rdzeń przedłużony oraz mózdzek. Natomiast brak lub zmiany są słabo zaznaczone w przednich odcinkach mózgu. W ciężkiej postaci choroby zmiany obejmują ponadto śródmózgowie, wzgórce i mózdzek. Stałą zmianą jest glioliza w mózdzku, zwłaszcza w jego części ziarnistej. Zmiany zwyrodnieniowe i zanik dotyczy komórek Purkiniego. W istocie szarej mózgu występuje wieloogniskowa glioliza, martwica neuronów, neurofagia i workólnaczyniowe nacieki limfocytów, makrofagów, niekiedy również neutrofilów. W ciężkich przypadkach nacieki obejmują oponę mięką i splot naczyński. Nie zawsze występuje zwyrodnienie wodniczkowe istoty białej (7).

Przedosadzeniowa biegunka norek (PMD) cechuje się dużą zachorowalnością i śmiertelnością. Choroba dotyczy norcząt w wieku 1–4 tyg. Wirus atakuje przewód pokarmowy i najważniejszym objawem jest biegunka. Kał ma konsystencję od śluzowatej do lepkiej. Choroba ma charakter polietologiczny. Z przypadków chorobowych izoluje się oprócz astrowirusów *Campylobacter jejuni*, reowirusy i kaliciwirusy. Czynnikiem usposabiającym jest nadmierne zagęszczenie, złe warunki higieniczne, zapalenie gruczołu sutkowego karmiących samic. (4, 19, 20).

W zespole mokrych norcząt (WMS) najprawdopodobniej następstwem ogólnej wirerii jest zajęcie gruczołów łojowych i potowych okolicy szyjnej.

Rozpoznanie

Objawy kliniczne i wywiad epizootyczny nie wystarczają do postawienia prawidłowego rozpoznania choroby. Rozpoznanie SMS jest możliwe w oparciu o wykazanie wirionów w mikroskopie elektronowym próbek mózgu i móżdżku, badanie testem ELISA, immunofluorescencją oraz stwierdzenie kwasu nukleinowego astrowirusa testem RT-PCR (4) Testem RT-PCR jest możliwe określenie, przynajmniej w człowieka, wszystkich genotypów astrowirusa. Astrowirus występuje też w kale chorzych norcząt. W rozpoznaniu różnicowym należy uwzględnić nosówkę (21), chorobę aleucką (22), zakażenie pierwotniakiem *Sarcocystis neurona* (23), toksoplazmozę (24) i zakażenie wirusem choroby Newcastle (25).

Postępowanie

Leczenia brak. W profilaktyce efekty przynoszą działania podejmowane w innych chorobach zakaźnych nerek mające na celu likwidację lub ograniczenie źródła zakażenia i transmisję choroby. Istnieją też zalecenia eutanazji chorych zwierząt oraz eliminacji z hodowli chorych matek i ich miotów, z chwilą kiedy zostanie stwierdzone SMS i potwierdzone badaniem histopatologicznym.

Piśmiennictwo

- Mardis E. R.: Next-generation DNA sequencing methods. *Ann. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2008, **9**, 387-402.
- Finkbeiner S. R., Kirkwood C. D., Wang D.: Complete genome sequence of a highly divergent astrovirus isolated from a child with acute diarrhoea. *Virology* **2008**, **5**, 117-123.
- Blomström A. L.: Applications of viral metagenomics in the veterinary field. Looking for the unknown. *Acta Universitatis Agriculturae Sueciae*, Uppsala 2010, **85**, 1-74.
- Mittelholzer C., Hedlund K. O., Englund L., Dietz H. H., Svensson L.: Molecular characterization of a novel astrovirus associated with disease in mink. *J. Gen. Virol.* 2003, **84**, 3087-3094.
- Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S.: MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 2007, **24**, 1596-1599.
- Englund L., Chmiel M., Dietz H. H., Hedlund K. O.: Astrovirus epidemiologically linked to preweaning diarrhoea in mink. *Vet. Microbiol.* 2002, **85**, 1-11.
- Gavie-Widén D., Brojer C., Dietz H. H., Englund L., Hammer A. S., Hedlund, Hard af Segerstad C., Nilsson K., Nowotny N., Puurula V., Thoren P., Uhlhorn H., Weissenböck H., Agren E., Klingeborn B.: Investigations into shaking mink syndrome: an encephalomyelitis of unknown cause in farmed mink (*Mustela vison*) kits in Scandinavia. *J. Vet. Diagn. Investig.* 2004, **16**, 305-312.
- Schmitz J.A., Wustenberg W., Gorham J.R.: Nonsuppurative meningoencephalitis of unknown etiology in mink. *Vet. Pathol.* 1985, **22**, 112-116.
- Blomström A.K., Widén E., Hammer A.S., Belák S., Berg M.: Detection of a novel astrovirus in brain tissue of mink suffering from shaking mink syndrome by use of viral metagenomics. *J. Clin. Microbiol.* 2010, **48**, 4392-4396.
- Moser L. A., Schultz-Cherry S.: Pathogenesis of astrovirus infection. *Viral Immunol.* 2005, **18**, 4-10.
- Quan P. L., Wagner T. A., Briese T., Torgerson T. R., Hornig M., Tashmukhamedova A., Firth C., Palacios G., Basire-De-Leon A., Paddock C. D., Hutchison S. K., Egholm M., Zaki S. R., Goldman J. E., Ochs H. D., Lipkin W. L.: Astrovirus encephalitis in boy with X-linked agammaglobulinemia. *Emerg. Infect. Dis.* 2010, **16**, 918-925.
- Madeley C.R., Cosgrove B.P.: Letter: 28 nm particles in faeces in infantile gastroenteritis. *Lancet.* 1975, **306**, 461.
- Martella V., Moschidou P., Pinto P., Catella C., Desario C., Larocca V., Circella E., Banyai K., Lavazza A., Magistrali C., Decaro N., Buonavoglia C.: Astroviruses in rabbits. *Emerg Infect Dis.* 2011, **17**, 2287-2293.
- Imada T., Yamaguchi S., Mase M., Kusakamoto K., Kubo M., Modroka A.: Avian nephritis virus (ANV) as a new member of the family Astroviridae and construction of infection ANV cDNA. *J. Virol.* 2000, **74**, 8484-8493.
- Szlezczuk P.: Wirusowe zapalenie nerek ptaków. *Medycyna Wet.* 1975, **51**, 56-71.
- King A.M.Q., Adams M.J., Carstens E.B., Lefkowitz E.J.: *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier, 2011.
- De Benedictis P., Schulz-Cherry S., Burnham A., Cattoli G.: Astrovirus infections in humans and animals – molecular biology, genetic diversity, and interspecies transmissions. *Infect. Genet. Evol.* 2011, **7**, 1529-1544.
- Działo J., Deptuła W.: Systematyka wirusów kręgowców – aktualne dane. *Kosmos* 2010, **59**, 435-449.
- Englund L., Chmiel M., Dietz H.H., Hedlund K.O.: Astrovirus epidemiologically linked to preweaning diarrhoea in mink. *Vet. Microbiol.* 2002, **85**, 1-11.
- Jorgensen M., Scheutz F., Strandbygaard B.: *Escherichia coli* and virus isolated from "sticky kits". *Acta Vet. Scand.* 1996, **37**, 163-169.
- Page WG, Green RG: An improved stain for distemper inclusions. *Cornell Vet.* 1942, **77**, 265-268.
- Dyer N.W., Ching B., Bloom M.E.: Nonsuppurative meningoencephalitis associated with Aleutian mink disease parvovirus infection in ranch mink. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2000, **12**, 159-162.
- Dubey J.P., Hedstrom O.R.: Meningoencephalitis in mink associated with a *Sarcocystis* neurona-like organism. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1993, **5**, 467-471.
- Frank R.K.: An outbreak of toxoplasmosis in farmed mink (*Mustela vison*). *J. Vet. Diagn. Invest.* 2001, **13**, 245-249.
- Haagsma J., Rondhuis P.R., Lensing H.H.: Meningoencephalitis in mink (*Mustela vison*), caused by the virus of Newcastle disease. *Tijdschr. Diergeneesk.* 1975, **100**, 781-783.

Prof. zw. dr hab. mgr Z. Gliński, Katedra Epizootiologii i Kliniki Chorób Zakaźnych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej UP w Lublinie, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin