

AFRYKAŃSKI POMÓR ŚWIŃ — WYBRANE ASPEKTY DIAGNOSTYKI LABORATORYJNEJ, EPIDEMIOLOGII I OCENY RYZYKA

STRESZCZENIE

Pojawienie się w 2014 roku na terenie Polski afrykańskiego pomoru świń (ASF), powodującego poważne konsekwencje epizootyczne i ekonomiczne spowodowało konieczność podejmowania działań zapobiegających rozprzestrzenianiu się choroby. Brak możliwości leczenia i skutecznej szczepionki sprawia, że szybka i wiarygodna diagnostyka laboratoryjna, analiza ryzyka wprowadzenia wirusa oraz ocena wpływu różnych czynników ekologicznych na szerzenie się choroby mają największe znaczenie w zwalczaniu i zapobieganiu rozprzestrzeniania się ASF na nowe obszary.

W Polsce, w diagnostyce ASF, w latach 2014–2016 stosowano metody serologiczne oraz molekularne. Aby zapewnić uzyskanie niepodważalnego wyniku dokonano walidacji testu immunoperoksydazowego (IPT) z zastosowaniem próbek krwi i surowicy oraz testów Real-Time PCR z wykorzystaniem krwi, surowicy, narządów wewnętrznych, kości, mięśni, zeszkrobiny z kości, ślinianki od świń i dzików oraz moczu, śliny, wymazu z nosa, kału, skóry, konserwy mięsnej, mięsa po obróbce termicznej od świń, a także produktów pochodzenia zwierzęcego, kontaminowanych plazmidem z wklonowanym fragmentem genu kodującego białko VP72. Ocenione w przeprowadzonych badaniach parametry walidacyjne wykazały 100% czułość, specyficzność, powtarzalność, odtwarzalność, selektywność dla techniki serologicznej (IPT) i molekularnej (Real-Time PCR) oraz granicę wykrywalności dla testów Real-Time PCR od 7,12 kopii/ μ l do $7,12 \times 10^2$ kopii/ μ l. Powyższe parametry potwierdziły wiarygodność przeprowadzonych badań i użyteczność opracowanych technik do rutynowego stosowania. Przeprowadzona w ramach walidacji analiza warunków przechowywania próbek w różnych temperaturach nie wykazała istotnego ich wpływu na wykrywanie materiału genetycznego ASFV.

Na podstawie wykonanych badań wykazano, że na wyniki testów serologicznych ma wpływ jakość próbek, a na wyniki testów molekularnych rodzaj użytego materiału. Niska jakość próbek krwi powodowała, że w testach serologicznych uzyskiwano niespecyficzne lub trudne w interpretacji wyniki. Po zbadaniu próbek krwi ze znaczną hemolizą od dzików padłych z zastosowaniem testu ELISA, 92,04% wyników dodatnich i wątpliwych nie zostało potwierdzonych testem IB lub IPT, a u odstrzelonych 96,39%. Wyniki uzyskane z zastosowaniem testów Real-Time PCR wykazały 100% wykrywalność materiału

genetycznego ASFV w narządach lub kościach pobranych od świń i dzików, a mniejszą we krwi, która wyniosła 94,08% dla świń, 71,43% dla dzików padłych i powypadkowych oraz 32,56% dla dzików odstrzelonych. Uzyskane wartości Ct dla różnych tkanek/narządów pochodzących zarówno od różnych jak i tych samych osobników były niższe dla narządów mięsnych niż dla krwi lub kości.

Analiza statystyczna wykonana z zastosowaniem testu χ^2 dla próbek krwi, wykazała wysoki stopień korelacji pomiędzy testami IPT i Real-Time PCR po zbadaniu próbek od świń oraz przeciętny stopień korelacji pomiędzy tymi testami po zbadaniu próbek od świń, dzików (padłych, powypadkowych, odstrzelonych) oraz próbek od dzików odstrzelonych. Kolejna analiza wykazała korelacje na bardzo wysokim poziomie pomiędzy wynikami testów Real-Time PCR dla narządów i IPT oraz na wysokim Real-Time PCR dla krwi i IPT, Real-Time PCR dla narządów i IB, Real-Time PCR dla krwi i IB biorąc pod uwagę próbki od wszystkich zwierząt razem (świń, dzików padłych, powypadkowych i odstrzelonych). Analiza przeprowadzona oddzielnie dla świń, dzików padłych, powypadkowych i odstrzelonych wykazała bardzo wysoki stopień korelacji pomiędzy wynikami testów Real-Time PCR dla narządów i IPT u świń, Real-Time PCR dla krwi i IPT u świń oraz Real-Time PCR dla narządów i IPT u dzików padłych. Ponadto u dzików padłych wysoki stopień korelacji stwierdzono pomiędzy wynikami testów Real-Time PCR dla narządów i IB oraz Real-Time PCR dla krwi i IB. Wyniki potwierdziły zasadność stosowania w badaniach diagnostycznych testów molekularnych i serologicznych. Korelacje dla wyników testów ELISA i IPT, ELISA i IB, ELISA i Real-Time PCR nie występowały lub kształtowały się na słabym i nikłym poziomie w zależności od badanej grupy zwierząt.

W Polsce, w latach 2014–2016 po zbadaniu próbek od 125393 świń i 44846 dzików ASF stwierdzono u 189 świń, 184 dzików padłych, 3 powypadkowych i 48 odstrzelonych, przy czym materiał genetyczny ASFV stwierdzano częściej niż obecność przeciwciał. Natomiast obecność DNA ASFV lub przeciwciał stwierdzano częściej u dzików padłych niż u odstrzelonych. Ocena sytuacji epidemiologicznej ASF w oparciu o zbadanie próbek terenowych wykazała lepszą efektywność monitoringu biernego u dzików padłych w porównaniu do monitoringu czynnego u dzików odstrzelonych.

W Polsce, w latach 2014–2016, choroba wystąpiła w 10 powiatach (sokólskim, białostockim, hajnowskim, siemiatyckim, monieckim, bialskim, łosickim, bielskim, wysokomazowieckim, zambrowskim) i 3 województwach (podlaskim, lubelskim, mazowieckim). Ogniska odnotowano głównie w gospodarstwach przyzagrodowych, a za źródła zakażeń uznano dziki, świnie lub działalność człowieka.

Analizy rozprzestrzeniania choroby w Polsce dokonano m.in. poprzez obliczenie powierzchni zakażonej wokół stwierdzonych przypadków i ognisk w poszczególnych miesiącach, w 2014, 2015 i 2016 roku. Powierzchnia zakażona w latach 2014–2016 była niewielka ale sukcesywnie wzrastała. Na koniec 2016 roku obszar zakażony wokół ognisk osiągnął 4170,5 km², a wokół przypadków był prawie 2-krotnie większy i wyniósł 7012,7 km².

W Polsce, w latach 2014–2016 choroba szerzyła się głównie wzdłuż wschodniej granicy w kierunku południowym i zachodnim. Największe odległości w linii prostej w kierunku północ-południe między skrajnymi ogniskami wyniosły 145 km a przypadkami 148 km. Maksymalne odległości od wschodniej granicy w kierunku zachodnim wyniosły 113 km dla ognisk i 75 km dla przypadków.

Analiza odległości i pojawiania się przypadków ASF po południowej i północnej stronie Jeziora Siemianowskiego wykazała czasowy hamujący wpływ naturalnych barier geograficznych na przesuwanie się zakażeń.

W celu dokładniejszego poznania szerzenia się choroby na różnych obszarach oceniono prevalencję miesięczną, roczną i sezonową zakażeń ASFV. Prewalencja roczna w latach 2014, 2015, 2016 dla powierzchni całego kraju oceniona na podstawie badań próbek pobranych od dzików padłych wyniosła odpowiednio 2,52%, 2,92% i 6,18%, a na podstawie badań próbek od dzików odstrzelonych 0,07%, 0,16% i 0,24%. Natomiast dla obszaru rzeczywistego na podstawie badania próbek od dzików padłych osiągnęła 50,00%, 47,55% i 43,87%, a na podstawie badania próbek od dzików odstrzelonych 0,38%, 0,29% i 0,40%. Prewalencja miesięczna i roczna była wyższa u dzików padłych niż odstrzelonych i różniła się w kolejnych miesiącach i latach, na różnych obszarach. Prewalencja sezonowa u dzików padłych była najwyższa latem na obszarze całego kraju, 7 i 2 powiatów, a na obszarze rzeczywistym zimą, natomiast najniższa jesienią na wszystkich analizowanych obszarach. Prewalencja sezonowa u dzików odstrzelonych była najwyższa latem na obszarze całego kraju, 7 powiatów i obszarze rzeczywistym, a na obszarze 2 powiatów jesienią, natomiast najniższa wiosną na wszystkich analizowanych obszarach. Ponadto analiza wykazała istnienie związku pomiędzy sezonem a prevalencją zakażeń ASFV u dzików padłych.

W pracy oceniono również wpływ odstrzału na prevalencję zakażeń ASFV u dzików. Stwierdzono przeciętną ujemną korelację biorąc pod uwagę obszar całego kraju, gdzie odstrzał wpłynął na krótkoterminowe zmniejszenie prevalencji u dzików (padłych i odstrzelonych) w miesiącu odstrzału oraz miesiąc po odstrzale. Analizując obszar 7 powiatów, odstrzał ograniczał występowanie ASF w następnym miesiącu po odstrzale. Natomiast na obszarze rzeczywistym odstrzał ograniczył prevalencję w 3 miesiącu po odstrzale (korelacja Spearmana), a według Pearsona do 3 miesięcy po odstrzale.

Ponadto w pracy przeprowadzono analizę statystyczną z zastosowaniem testu χ^2 do oceny zależności pomiędzy seroprewalencją ASFV a wiekiem i płcią dzików. Analiza nie wykazała istotnych różnic pomiędzy seroprewalencją a wiekiem oraz seroprewalencją a płcią.

W celu zobrazowania potencjalnego zagrożenia ASF przeprowadzono ocenę ryzyka wprowadzenia wirusa do Polski z krajów nadbałtyckich za pośrednictwem legalnego przemieszczania żywej trzody chlewnej przy założeniu wprowadzania świń z obszarów wolnych od choroby. Ryzyko wyniosło $3,28 \times 10^{-2}$ co odpowiada przeciętnie wprowadzeniu jednej zakażonej świni raz na 30 lat.

SUMMARY

African swine fever appeared in Poland in 2014 and its emergence had far-reaching epizootic and economic consequence; disease prevention became paramount as no effective treatment or vaccinations exist. Fast and reliable laboratory diagnostics, a virus introduction risk analysis and assessment of the impact of ecological factors on the disease spread are some of the key factors in combating and containing the disease, preventing its emergence in previously unaffected areas.

In the years 2014–2016 the diagnostic methods used in Poland were serological and molecular; in order to ensure irrefutability of the diagnostic results it was necessary to validate the immunoperoxidase test (IPT) using blood and serum samples, and the Real-Time PCR test using samples of blood, serum, internal organ tissues, bone, muscle, medullary cavity scrapings, salivary glands from pigs and wild boars, urine, saliva, nasal swabs, faeces, skin, canned meat, heat-treated pork meat and animal products contaminated with a plasmid containing a fragment of the gene coding VP72 protein. Parameters assessed in the evaluation showed 100% sensitivity, specificity, repeatability, reproducibility and selectivity for both the serological technique (IPT) and the molecular technique (Real-Time PCR); detection limits for the Real-Time PCR tests were from 7.12 copies/ μ l to 7.12×10^2 copies/ μ l. The parameters confirmed reliability of the tests conducted and applicability of the developed methods for routine use. As part of the validation process conditions of sample storage in different temperatures were assessed; no impact on the detectability of ASFV genetic material was established.

The study conducted showed that serological tests results were affected by sample quality, while molecular tests were influenced by the type of material used. Low quality of blood samples led to results which were non-specific or hard to interpret. When testing highly haemolysed blood samples from dead wild boars, 92.04% of positive or borderline ELISA test results were not confirmed by IB or IPT; in hunted wild boars the proportion was 96.39%. The results of Real-Time PCR showed 100% detectability of ASFV genetic material in organs and bones of wild boars and pigs; detectability in blood samples was lower and was 94.08% for pigs, 71.43% for dead wild boars or killed in accidents and 32.56% for wild boars killed in hunts. Ct values for tissues and organs from different or the same animals were lower for solid organs than for blood and bones.

A statistical analysis using the χ^2 test for blood samples showed a high correlation between IPT and Real-Time PCR for pig samples and an average correlation for samples from both pigs and wild boars (dead, killed in accidents and hunted) and hunted wild boars alone.

Another analysis demonstrated a very high correlation between Real-Time PCR of organs and IPT; a high correlation between blood Real-Time PCR and IPT, organ Real-Time PCR and IB and blood Real-Time PCR and IB when all animal samples were considered (pigs and wild boars: hunted, dead and killed accidentally). Analyses conducted separately for pigs and for dead wild boars, killed accidentally and hunted showed a very high degree of correlation between the results of organ Real-Time PCR and IPT in pigs, blood Real-Time PCR and IPT in pigs and organ Real-Time PCR and IPT in dead wild boars. Moreover, in the dead wild boars a high degree of correlation was shown between organ Real-Time PCR and IB and blood Real-Time PCR and IB. The results confirmed the validity of using molecular and serological tests in diagnostics. Correlations for ELISA and IPT, ELISA and IB and ELISA and Real-Time PCR tests were not found or were found in low or very low proportions, depending on the animal groups tested.

In the years 2014–2016, in Poland, 125393 swine samples and 44846 wild boar samples were tested. ASF was confirmed in 189 pigs, 184 wild boars dead, 3 wild boars killed in accidents and 48 wild boars hunted; ASFV genetic material was detected more commonly than antibodies. The presence of ASFV DNA or antibodies was detected more often in the wild boars dead than in the wild boars hunted. Assessment of ASF epidemiology based on samples collected in the field showed higher effectiveness of passive monitoring of dead wild boars in comparison with active monitoring of hunted wild boars.

In 2014–2016 in Poland ASF was present in 10 poviats (administrative sub-regions): Sokólski, Białostocki, Hajnowski, Siemiatycki, Moniecki, Bialski, Łosicki, Bielski, Wysokomazowiecki and Zambrowski, and 3 voivodships (provinces): Podlaskie, Lubelskie and Mazowieckie. Outbreaks were noted mainly on small farms and the infection was thought to have originated from wild boars, pigs or human activity.

Analyses of the disease spread in Poland were performed, among others, by calculating the affected area around the cases and outbreaks found in particular months in 2014, 2015 and 2016. The area contaminated in the years 2014–2015 was not particularly large, but it increased successively. At the end of 2016 the contaminated area around the outbreaks was 4170.5 km² and around the cases was almost double, at 7012.7 km².

From 2014 to 2016 in Poland the disease spread reached west and south along the eastern border. On the longitudinal axis the largest distance between outbreaks was 145 km, and between cases 148 km. The largest distance from the eastern border towards the westernmost outbreak was 113 km and for the westernmost case it was 75 km.

Analyses of distances and ASF case prevalence to the north and south of Siemianowskie Lake indicated that natural barriers may temporarily hinder the disease spread.

To further the study of the disease spread in different areas, prevalence of ASF was assessed on a monthly, yearly and seasonal basis. The yearly prevalence in 2014, 2015 and 2016 calculated for the area of the entire country basing on the samples collected from dead wild boars was respectively 2.52%, 2.92% and 6.18%; the samples from hunted wild boars showed the prevalence of 0.07%, 0.16% and 0.24%. The prevalence in disease-affected areas estimated on the basis of the samples collected from dead wild boars was respectively 50.00%, 47.55% and 43.87%, while the samples from hunted wild boars showed the prevalence of 0.38%, 0.29% and 0.40% respectively. Monthly and yearly prevalence was higher in dead wild boars than in hunted wild boars and it varied in months and years in different locations. Seasonal prevalence in dead wild boars was at its highest in summer in the entire country and in selected groups of 7 and 2 poviats; in affected areas it was highest in winter. The prevalence was lowest in autumn in all areas analysed. Seasonal prevalence in hunted wild boars was highest in summer in the entire country, in 7 poviats and in the affected area; in 2 poviats it was highest in autumn and it was lowest in spring in all the areas analysed. Moreover, the analysis showed a correlation between seasons and the prevalence of ASFV in dead wild boars.

The impact of hunting on the prevalence of ASFV infections in wild boars was also assessed. An average negative correlation was found in the area of the entire country, where hunting caused short term decrease of the prevalence in wild boars, both hunted and dead, in the month of hunting and the month after. The analysis of 7 poviats showed that the prevalence of ASF was limited in the month following the hunting. In the disease-affected areas hunting limited the prevalence in the 3rd month following the hunts (Spearman correlation); according to Pearson it was limited for up to three months later.

The study also comprised a statistical analysis using the χ^2 test to assess a correlation between seroprevalence of ASFV and age and sex of wild boars. The analysis did not show significant differences between seroprevalence and age or seroprevalence and sex.

Import of live pigs from Baltic countries, on the assumption of disease free areas, poses a potential threat of introducing the ASF virus to Poland; the risk was assessed and calculated to be at the level of 3.28×10^{-2} . This value indicates introducing mean one infected pig once every 30 years.