

STRESZCZENIE

IAV występuje u człowieka, oraz u wielu różnych gatunków ptaków i ssaków, w tym świń, koni, norek, fok, wielorybów, kotów i psów. Charakteryzuje się dużą zmiennością genotypową i fenotypową. Zmienność ta oparta jest na dwóch mechanizmach: przesunięciu antygenowym, wynikającym z braku zdolności polimerazy wirusowej do korekty błędów transkrypcyjnych oraz skoku antygenowym, będącym, między innymi, konsekwencją segmentowanej budowy materiału genetycznego IAV. Pozwala to na ciągłe krążenie szczepów IAV w populacji, a także na przełamywanie bariery gatunkowej. W związku z tym dokładne poznanie czynników sprzyjających zmienności IAV oraz pokonywaniu barier międzygatunkowych pozwoli identyfikować szczepy IAV, które stanowią potencjalne zagrożenia dla zdrowia publicznego.

W celu prześledzenia mechanizmów zmienności AIV przeprowadzono trzy doświadczenia. W pierwszym eksperymencie próbowano zaadoptować szczep A/duck/Bavaria/77 AIV do organizmu świni w wyniku pasaży *in vivo*. Pomimo braku u zakażonych zwierząt objawów klinicznych charakterystycznych dla ostrej postaci grypy świń w czasie trwania całego doświadczenia, w próbkach tkanki płucnej od świń ze wszystkich pasażów stwierdzano obecność materiału genetycznego AIV. Istotna poprawa replikacji AIV miała miejsce od pasaży 19. Od tego pasaży większość próbek homogenatów tkankowych od zwierząt zakażonych miała wartość $Ct < 35$, ponadto w płucach od wszystkich świń, z wyjątkiem płuc knurka z pasaży 24, obserwowano ogniska zapalne. Poza tym AIV w pasażach 19, 20, 23 i 24 wykazał zdolność do transmisji. W wyniku analizy sekwencji stwierdzono, że istotne znaczenie w adaptacji A/duck/Bavaria/77 AIV do organizmu świni miało równoczesne występowanie dwóch mutacji w HA, E204D oraz G239E. Pierwsza z nich pojawiła się już w pasażu 8, ale dopiero utrwalenie się drugiej mutacji w pasażu 19 pozwoliło AIV na lepszą replikację u trzody chlewnej.

W drugim eksperymencie badano transmisję AIV pomiędzy świniami, w związku z czym do doświadczalnie zakażonych zwierząt z pasażów 5, 8, 10, 15, 19, 20, 23 i 24 wprowadzono świnię kontaktową. Podobnie jak zwierzęta zakażone, świni kontaktowe nie wykazywały objawów klinicznych. Ponadto nie stwierdzono siewstwa AIV u zwierząt kontaktowych z pierwszymi czterech ww. pasażów. Natomiast próbki wymazów z nosa od zwierząt z pozostałych czterech pasażów (pasaży 19, 20, 23, 24) w większości były dodatnie. Również w badaniach serologicznych testem IPMA próbki surowic od zwierząt z pasażów 5, 8, 10 i 15 były ujemne, a surowice od świń z pasażów 19, 20 i 24 były dodatnie, miano wahało się

od 32 do 256. W związku z siewstwem wirusa, niektóre zwierzęta kontaktowe poddano eutanazji i pobrano od nich próbki do badań wirusologicznych i molekularnych. W teście RRT-PCR stwierdzono wynik dodatni dla wszystkich świń, z wyjątkiem loszki kontaktowej z pasażu 20. W pasażu 23 i 24 do zwierząt kontaktowych wprowadzono kolejną grupę świń i w przypadku pasażu 23 zwierzęta te wykazywały siewstwo AIV. Analizując wykres siewstwa w pasażu 23 można stwierdzić, że loszka kontaktowa z grupy pierwszej zakaziła knurka z tej samej grupy oraz dwie świnię z drugiej grupy kontaktowej. W przypadku AIV z pasażu 19 i 23 porównano sekwencje nukleotydowe izolatów od zwierząt zakażonych i kontaktowych. Stwierdzono trzy różnice, jedną w białku PA w pozycji 613 (pasaż 23) oraz dwie w białku NA w pozycji 33 (pasaż 19) i 134 (pasaż 23). Mutacja S134T może mieć znaczenie dla nabytej lepszej zdolności do transmisji izolatu od loszki kontaktowej z pasażu 23.

Trzeci eksperyment oparty był na koinfekcji 6 świń AIV A/duck/Italy/1447/05 (H1N1) i SIV Sw/Gent/172/08 (H3N2), w celu zbadania procesu reasortacji *in vivo* i powstałych wariantów IAV. Do zakażonych zwierząt wprowadzono w 2 dpz 6 świń kontaktowych. Koinfekcję potwierdzono testem IPMA, uzyskując miano przeciwciał specyficznych dla SIV od 1024 do 4096, a dla AIV od 32 do 512. Do 10 dpz/dpk pobierano wymazy z nosa, a w 4 dpz/dpk od 6 świń (3 zakażonych, 3 kontaktowych) pobrano próbki tkanek. Wszystkie próbki wymazów z nosa i tkanek, których wartość Ct była < 35 oczyszczano przy pomocy testu łyśinkowego. Uzyskane izolaty IAV poddawano charakterystyce molekularnej. Na 228 uzyskane izolaty, 220 szczepy określono jako SIV, 5 jako AIV, natomiast pozostałe 3 izolaty były reasortantami o podtypie H1N1 z pojedynczym genem pochodzącym od SIV (gen M/NP). Częstotliwość występowania reasortantów użytych szczepów sugeruje ich małą kompatybilność genetyczną.

Podsumowując można stwierdzić, że adaptacja AIV do organizmu świni, zarówno w wyniku przesunięcia, jak i skoku antygenowego, jest procesem złożonym i długotrwałym. W adaptacji podstawowe znaczenie mają same szczepy AIV i ich kompatybilność z czynnikami gospodarza, jak również szczepami SIV.

SUMMARY

IAV infect humans, birds and a large variety of mammal species, including pigs, horses, mink, seals, whales, cats and dogs. IAV is characterized by high genotypic and phenotypic variability. It is based on two mechanisms: antigenic shift, resulting from the inability of the virus polymerase to correct errors during gene transcription, and antigenic drift, which is, among others, the consequence of segmental structure of IAV genetic material. This allows IAV strains to continuous circulation in the population, and to overcome species barrier. Therefore, learning about factors contributing to the variability of IAV and helping overcome interspecies barriers will allow to identify IAV strains that are the potential threat to public health.

In order to investigate the mechanisms of AIV variability three experiments were performed. In the first experiment an adaptation of A/duck/Bavaria/77 AIV strain to pig by *in vivo* passages was performed. Despite the lack of clinical signs characteristic for acute swine influenza in infected pigs during the entire experiment, in the tissue samples of pigs from all passages we found genetic material of AIV. Significant improvement in AIV replication occurred in the passage 19. From this passage the majority of the tissue homogenate samples from infected pigs have Ct value < 35. Furthermore, in the lungs of all pigs, with the exception of the lung of boar from the passage 24, lesions were observed. Moreover, in the passage 19, 20, 23 and 24 AIV showed the ability to transmit. After nucleotide sequence analysis we concluded, that for the A/duck/Bavaria/77 AIV adaptation to pig the simultaneous presence of two mutations E204D and G239E in HA is essential. The mutation E204D appeared in passage 8, but only when mutation G239E became established in passage 19, it allowed AIV to better replicate in pigs.

In the second experiment transmission of AIV between pigs was studied. Therefore, we introduced sentinel pigs to experimentally infected pigs from passage 5, 8, 10, 15, 19, 20, 23 and 24. Sentinel pigs, like infected animals showed no clinical signs of swine influenza. Moreover, sentinel pigs from the first four passages mentioned above shed no AIV, whereas the majority of samples of nasal swabs of pigs from passage 19, 20, 23 and 23 were positive. Also in serological tests (IPMA test) serum samples of pigs from passage 5, 8, 10 and 15 were negative, whereas sera of pigs from passage 19, 20, 23 and 23 were positive (antibody titer - from 32 to 256). Based on the results of virus shedding some pigs were euthanized. The tissue samples for virological and molecular tests were obtained. In RRT-PCR test samples from all pigs

were positive, except from sentinel gilt from passage 20. In passages 23 and 24, second group of sentinel pigs were introduced, and in passage 23 these animals shed the virus. Analysing the chart of shedding in the passage 23 it can be stated that sentinel gilt from the first group infected the boar and two pigs from the second sentinel group. In the case of AIV from passage 19 and 23, the nucleotide sequences of isolates from infected and sentinel pigs were compared. Three differences were found. In PA protein at position 613 (passage 23) and in NA at position 33 (passage 19) and 134 (passage 23). Mutation S134T may play a role in acquired improved ability to transmission of isolate from sentinel gilt from passage 23.

In order to examine the process of reassortment *in vivo* and creation of IAV variants, in third experiment co-infection of 6 pigs with AIV A/duck/Italy/1447/05 (H1N1) and SIV Sw/Gent/172/08 (H3N2) was performed. Co-infection was confirmed by IPMA test. The titer of specific antibody for SIV and for AIV was 1024-4096 and 32-512, respectively. Nasal swabs were collected till 10 dpi/dpc. At 4 dpi/dpc 6 pigs (3 infected, 3 sentinel) were euthanized and tissue samples were collected. All nasal swabs and tissue samples with Ct volume < 35 were used in plaque purification test. Obtained IAV isolates were molecularly characterized. Out of 228 isolates, 220 strains were SIV, 5 strains were AIV and 3 strains were H1N1 reassortants with one gene of swine origin (M or NP gene). Frequency of the reassortment of used strains suggests their small genetic compatibility.

It can be concluded that the adaptation of AIV to pig, both by the antigenic shift and antigenic drift, is a complex and long-term process. In the process of adaptation the strains of AIV and their compatibility with host factors, as well as with SIV strains, are essential.