

Streszczenie

Afrykański pomór świń (ASF) jest jedną z najważniejszych chorób zakaźnych świń domowych oraz dzików, notowaną do Światowej Organizacji Zdrowia Zwierząt (OIE), podlegającą obowiązkowi urzędowego zwalczania. Wystąpienie ASF na danym terenie jest przyczyną ograniczeń w handlu trzodą chlewną oraz produktów pochodnych, a tym samym poważnych, negatywnych skutków gospodarczych. W Polsce od momentu stwierdzenia pierwszego, historycznego przypadku tej choroby obserwuje się wzrost zachorowań zarówno w stadach trzody chlewnej jak i w populacji dzików. Sytuacja taka ma miejsce również w pozostałych krajach Europy, w których wystąpiła choroba, co wskazuje na duże ryzyko dalszego rozprzestrzeniania się wirusa na nowe obszary. Do tej pory nie opracowano szczepionki przeciwko ASFV, co wynika ze złożoności genomu i niepełnej jeszcze wiedzy na temat patogenezy zakażeń tym wirusem. Z tego względu jedynymi sposobami kontroli rozprzestrzeniania ASF i walki z tą chorobą są wyłącznie środki administracyjne oraz właściwa i szybka diagnostyka laboratoryjna.

Zgodnie z celem rozprawy doktorskiej część badań dotyczyła opracowywania nowych metod do wykrywania materiału genetycznego ASFV. W KLR opracowano po raz pierwszy do diagnostyki ASF metodę amplifikacji krzyżowej (CPA) oraz łańcuchową reakcję spiralno-krzyżową (PCLSR), które mogłyby być stosowane alternatywnie do diagnostyki ASF. Zarówno CPA jak również PCLSR są najnowszymi odmianami technik biologii molekularnej, które przeprowadzane są w warunkach stałej temperatury przy minimalnych wymaganiach laboratoryjnych i nakładach finansowych. Obie metody zostały poddane szczegółowej ocenie możliwości diagnostycznych i porównane z referencyjną techniką UPL real-time PCR. Czas amplifikacji CPA jak i PCLSR był znacznie krótszy niż dotychczas stosowanych metod diagnostycznych i wynosił odpowiednio 45 i 60 minut. Nowo opracowane techniki były specyficzne wyłącznie dla DNA ASFV. Zagadnienie potencjalnych reakcji niespecyficznych jest priorytetowe przy stosowaniu metod amplifikacji w warunkach stałej temperatury. Obie metody pozwoliły na wykrycie DNA ASFV we wszystkich badanych próbkach terenowych. Granica wykrywalności została określona na poziomie 7,2 kopii DNA ASFV/ μ l dla CPA oraz 720 kopii DNA ASFV w przypadku metody PCLSR. Pomimo, że czułość PCLSR była niższa od czułości CPA, obie metody pozwoliły na wykrycie DNA ASFV we wszystkich badanych próbkach terenowych jak również wśród tych izolatów reprezentujących różne genotypy. Ponadto dzięki znacznej oporności na inhibitory reakcji obecne we krwi pozwalają na bezpośrednią identyfikację DNA wirusa, bez uprzedniej izolacji materiału genetycznego. Biorąc pod uwagę zalety obu metod jak: prostota wykonania, możliwość szybkiej detekcji, wysoka czułość i specyficzność stanowią one użyteczne narzędzia do badań diagnostycznych i epidemiologicznych oraz mogą stanowić uzupełnienie stosowanych obecnie metod diagnostycznych.

Celem kolejnego etapu badań była charakterystyka molekularna występujących na terenie Polski izolatów ASFV. W niniejszej pracy analizę różnorodności genetycznej przeprowadzono w oparciu o wybrane geny wirusa wpływające na interakcję z układem immunologicznym

gospodarza: A238L, EP153R, EP402R, MGF505-2R. Otrzymane wyniki potwierdziły przynależność polskich izolatów do genotypu II oraz ich pochodzenie od izolatu Georgia 2007/1, wprowadzonego na teren Gruzji w 2007 roku. Na podstawie sekwencjonowania genów EP153R oraz A238L wszystkie polskie izolaty cechowały się wysokim stopniem homologii na poziomie 100%. Łącznie ze szczepami referencyjnymi Georgia 2007/1 oraz Odintsovo 2/2014 utworzyły one w dendrogramach jednorodną grupę filogenetyczną. Jedynie analiza z wykorzystaniem genów EP402R oraz MGF505-2R wykazała zmienność, na skutek czego stopień identyczności sekwencji nukleotydowych polskich izolatów wyniósł od 99,47% do 100%. Zarówno analiza genu EP402R jak również MGF505-2R pozwoliła na wyodrębnienie kilku grup genetycznych izolatów ASFV krążących w Polsce. Na podobnym poziomie wynoszącym od 99,4% kształtował się poziom homologii sekwencji do dostępnych w bazie GenBank szczepów referencyjnych. Wykazano przydatność markerów MGF-5052R i EP402R w badaniach powiązań filogenetycznych a genu EP402R dodatkowo w analizie czasowo-przestrzennej, mającej na celu obserwację i przewidywanie przemieszczania się wirusa na danym terenie.

Podsumowując wyniki dotychczas przeprowadzonych badań, można stwierdzić, że wśród terenowych izolatów ASFV w minimalnym tylko stopniu zachodzi ewolucja czynników genetycznych związanych z unikaniem mechanizmów obronnych układu immunologicznego gospodarza. Są to pierwsze badania filogenetyczne izolatów ASFV występujących w Polsce, oparte na analizie patogenności na poziomie molekularnym. Pomimo tego, że kwestia czy stwierdzone zmiany sekwencji w genach EP402R i MGF505-2R mogą wpływać na zmiany przebiegu klinicznego choroby, wymaga dalszego badania z wykorzystaniem świń, to prezentowane wyniki stanowią znaczący wkład w uzupełnienie wiedzy na temat różnorodności genetycznej izolatów wirusa ASFV.

Summary

African swine fever (ASF) is one of the most fatal infectious diseases of domestic swine and wild boar, notified to the World Organization for Animal Health (OIE), subjected to official eradication. ASF occurrence in affected territories results in trade restrictions of pigs and pig products and consequently bears an important negative economic impact.

In Poland, since the first case of this disease has been recorded, there has been an increase in the incidence of outbreaks in swine herds and cases in wild boars. This situation also appears in other European countries where the disease has occurred. Therefore this situation emphasizes a very high risk of ASF spreading towards new, uninfected areas. Currently ASF vaccine has not been developed, what is hindered by high complexity of the ASFV genome and existing gaps in knowledge concerning ASFV pathogenesis. Therefore the only measures of ASF spread control refer to strict sanitary requirements and reliable and fast diagnosis.

According to the purpose of the presented dissertation, some part of the research involved development and application of novel diagnostic methods for detection of ASFV DNA. So far innovative molecular isothermal amplification methods including cross-priming amplification (CPA) and polymerase cross linking spiral reaction (PCLSR) have been first developed by the National Reference Laboratory in Pulawy as an alternative among ASF detection methods. Both CPA as well as PCLSR assays are the latest forms of molecular biology techniques that are conducted under constant temperature conditions with minimal laboratory and financial requirements. Both assays were assessed according to diagnostic capabilities and their effects were compared with reference UPL Real-Time PCR assay. The CPA and PCLSR amplification time was 45 and 60 minutes respectively. It was significantly shorter than the currently used ASF diagnostic methods. Both methods were specific exclusively to ASFV DNA. The potential of non-specific reactions is a priority when using isothermal amplification methods. The detection limit of CPA was set at 7,2 copies per μl of standard ASFV plasmid containing P72 gene while for PCLSR it was determined as 720 copies of the analyzed gene. Although, the sensitivity of PCLSR was slightly below the sensitivity of CPA, both assays were capable to detect DNA ASFV in all field samples as well as among isolates representing different genotypes. In addition, due to the significant resistance of blood inhibitors, they allow direct identification of the virus DNA without prior isolation of the genetic material. Taking into account the features of both methods such as simplicity and fast detection, high sensitivity and specificity, they are useful tools for diagnostic and epidemiological studies and may efficiently complement the classical diagnostic methods applied so far.

The purpose of the next stage of the presented research was molecular characterization of ASF strains circulating in wild boar and swine population in the territory of Poland. Studies concerning genetic diversity of ASFV in Poland have not been undertaken before.

In this paper, the genetic diversity analysis was based on selected virus genes affecting modulation of host-pathogen interaction: A238L, EP153R, EP402R, MGF505-2R.

The results confirmed the affiliation of Polish isolates to genotype II and their origin from the pathogenic isolate Georgia 2007/1, introduced in Georgia in 2007. Phylogenetic analysis, derived from A238L and EP153R gene sequences revealed 100% identity between all Polish isolates and with ASF-reference Georgia 2007/1 and Odintsovo 02/14 strains. All the analyzed isolates formed a homogeneous phylogenetic group at the dendrograms. The only minor genetic variability was revealed within EP402R and MGF505-2R genes, where nucleotide sequence identity was showed to be 99.47% to 100%. Both EP402R gene and MGF505-2R gene analysis led to distinguish several separated, distinct genetic groups in phylograms. The nucleotide sequence identity of Polish isolates to reference strains Georgia 2007/1 and Odintsovo 02/14 was at a similar level of 99,4%. The conducted studies revealed the usefulness of MGF505-2R and EP402R markers in the phylogenic study. Additionally EP402R gene was shown to be useful in spatio-temporal analysis aimed at observing and predicting the movement of the virus.

To sum up, based on the obtained results it can be concluded that among ASFV field isolates occurring in Poland there is only a minimal degree evolution of genetic factors associated with avoiding host immune system defense mechanisms. This is the first study providing the insight into pathogenesis on the molecular level of ASFV strains occurring in Poland. Although the issue of whether minor sequence variations in the EP402R and MGF505-2R genes can alter the clinical course of the disease, requires further study using pigs model. The results presented make a significant contribution to the knowledge about the genetic diversity of ASF isolates.