

Streszczenie

Afrykański pomór świń (ASF) jest zakaźną, wirusową chorobą świń i dzików, stanowiącą obecnie największe zagrożenie dla światowej produkcji trzody chlewnej. Od 2007 r. choroba w sposób niekontrolowany szerzy się w Europie Wschodniej. ASF w Polsce stwierdzono po raz pierwszy w 2014 r., a zasięg występowania choroby oraz liczba potwierdzanych zachorowań ulegają systematycznemu powiększeniu. Skutkiem tego, do końca 2019 r. w kraju udokumentowano łącznie 261 ognisk w stadach świń oraz 5824 przypadki u dzików, co spowodowało trudne do oszacowania straty ekonomiczne. Rezerwuar wirusa w środowisku stanowią szczątki padłych dzików.

W związku z dotychczasowym brakiem danych dotyczących kompleksowej charakterystyki molekularnej izolatów wirusa ASF izolowanych na terenie kraju na podstawie jego kompletnych genomów oraz niepełne informacje dotyczące wpływu czynników środowiskowych na przeżywalność ASFV, celem podjętej rozprawy doktorskiej było określenie zarówno szczegółowych właściwości molekularnych krajowych izolatów ASFV oraz poznanie czynników wpływających na jego przeżywalność.

W celu realizacji pierwszego etapu rozprawy zastosowano technikę sekwencjonowania następnej generacji (NGS). Podczas próby izolacji i namnażania krajowych izolatów ASFV wykazano, że jest to możliwe wyłącznie w komórkach pierwotnych makrofagów płucnych świń (PPAM), a ciągła linia unieśmiertelnionych makrofagów płucnych świń (IPAM) nie pozwala ani na izolację wirusa, ani na namnażanie wirusów wcześniej wyizolowanych w PPAM. Współczynnik sukcesu izolacji wirusa w badanych próbkach wyniósł 25%. Spośród 12 izolatów poddanych NGS, otrzymano 7 kompletnych sekwencji o pokryciu na poziomie 20–40-krotnym. Otrzymane sekwencje wirusów krążących w Polsce w latach 2016–2017 wykazały bardzo wysoki stopień podobieństwa do genomu referencyjnego i innych spokrewnionych szczepów z Eurazji wynoszący ponad 99,9%. Większość mutacji stanowiły polimorfizmy pojedynczych nukleotydów (SNP), jednakże zidentyfikowano również nieopisaną dotychczas insercję o długości 14 nt w obrębie genu O174L, stanowiącą tandemowe powtórzenie (TRS) ciągu nukleotydów.

W związku z tym, iż podobne powtórzenia są z powodzeniem stosowane w badaniach filogeograficznych nad ASFV jako „molekularne odciski palca” świadczące o pochodzeniu geograficznym, kolejnym celem pracy była analiza użyteczności wykrytej mutacji w charakterze markera molekularnego. W tym celu badano obecność nietypowej

sekwencji nukleotydowej w 46 próbkach DNA z lat 2014–2018 z wybranych regionów występowania ASF w Polsce metodą sekwencjonowania Sangera. Wykazano, że dodatkowa insercja w sekwencji nukleotydowej genu O174L jest obecna w 25% krajowych izolatów wirusa, pochodzących w większości z regionu położonego na styku województw podlaskiego, mazowieckiego, lubelskiego i Białorusi. Stwierdzona mutacja może być użytecznym narzędziem w kontekście markera molekularnego umożliwiającego śledzenie szerzenia się wirusa na terenie kraju. Ponadto wykazano, iż mutacja pojawia się również w dużych odległościach od największych skupisk przypadków ASF, w których potwierdzono obecność nietypowej sekwencji wirusa, co świadczyć może o udziale czynnika ludzkiego w rozprzestrzenianiu się choroby w kraju. Wyniki pierwszego etapu badań pozwoliły na wybór reprezentatywnego izolatu ASFV do dalszych badań na jego przeżywalność w różnych warunkach środowiska.

W drugim etapie badań wyznaczono okres półtrwania ($T_{1/2}$) oraz wskaźnik redukcji dziesiętnej (D-value) wirusa ASF w wybranych temperaturach (-20 , $+4$, $+23^{\circ}\text{C}$). Materiał do badań stanowiły zamieszczone wirusem tkanki (śledziona, nerki, płuca), które zostały pobrane od świń padłych z powodu ASF. Ponadto wyznaczono nieliniowy model regresji pozwalający przewidywać $T_{1/2}$ w zależności od temperatury. Zgodnie z danymi literaturowymi, ASFV okazał się patogenem wysoce stabilnym w temperaturze poniżej 0°C , jednakże jej wzrost, powoduje znaczny wzrost tempa inaktywacji wirusa. Wykazano, iż $T_{1/2}$ w temperaturze 4°C waha się między 1,94 (95% CI, 1,42–3,08), a 6,3 (95% CI, 5,00–8,55) dnia, zaś D-value między 6,46, a 20,95 dnia. W temperaturze zbliżonej do pokojowej, wirus ulegał szybkiej inaktywacji i już po 7 dniach miano ASFV w badanych tkankach spadło poniżej granicy wykrywalności. Wyniki real-time PCR nie były zgodne z wynikami analiz wirusologicznych, i pomimo upływu czasu wskazywały na wysoką zawartość wirusowego DNA w badanych próbkach. W drugiej części doświadczenia, analizowano wpływ otoczenia na tempo inaktywacji wirusa w tkankach świń lub dzików w temperaturach powyżej $+4^{\circ}\text{C}$. Podobnie jak poprzednio, temperatura $+23^{\circ}\text{C}$ spowodowała szybki rozkład tkanek prowadzący do inaktywacji wirusa, tak więc w 7 dniu inkubacji miano wirusa we wszystkich próbach było niższe od granicy wykrywalności, zaś obliczone wartości $T_{1/2}$ oraz D-value wynosiły odpowiednio 0,44 i 1,48 dnia. Temperatura 4°C okazała się być wystarczająca do utrzymania zakaźności tkanek przechowywanych w słomie, sianie i ziarnie przez przynajmniej 56 dni, ponadto zanotowano znaczny spadek stabilności wirusa w tkankach przechowywanych w glebie, wodzie i ściółce leśnej w porównaniu do kontroli, zaś

wyniki badań molekularnych, podobnie jak w pierwszej części doświadczenia, wskazywały na wysoką zawartość wirusowego DNA we wszystkich analizowanych próbkach. Podjęte badania jako pierwsze pozwoliły na wyznaczenie matematycznego modelu inaktywacji ASF podczas rozkładu tkanek, który w przyszłości może być przydatnym czynnikiem w ocenie ryzyka. Otrzymane wyniki podważają dotychczasowe poglądy dotyczące wysokiej oporności ASFV na warunki środowiska, i dowodzą szybkiego tempa inaktywacji wirusa w naturalnie rozkładających się tkankach padłych zwierząt.

Summary

African swine fever (ASF) is an infectious viral disease of swine and wild boar, which nowadays poses a threat for worldwide pig production. The disease has been uncontrollably spread in Eastern Europe since 2007. ASF was confirmed in Poland in 2014, and since then the affected area as well as the number of confirmed cases have consequently increased. Until the end of 2019, in total 261 outbreaks in domestic pigs and 5824 cases in wild boar have been notified, which caused severe economic loss. Wild boar carcasses play a crucial role in disease transmission being the main source of pathogen in the environment.

In view of lack of knowledge regarding in-depth molecular characterisation of Polish ASFV isolates based on their complete genomic sequences, as well as limited knowledge regarding ASFV persistence in different environmental conditions, the goal of this thesis was to determine the detailed molecular properties of ASFV isolates from Poland, as well as to estimate the environmental conditions which may affect the virus survivability.

In order to cope with the first part of this dissertation, the next generation sequencing (NGS) technique has been applied. During virus isolation attempts, it has been shown that porcine primary alveolar macrophages (PPAM) are exclusively permissive for replication of ASFV. Inversely, the continuous cell line of immortalized porcine alveolar macrophages (IPAM) provided no efficient virus isolation, nor propagation of the ASFV prior their isolation in PPAM cells. The rate of successfully isolated viruses reached up to 25 percent of samples. Seven complete genomic sequences with coverage from 20 to 40 times were obtained from 12 virus isolates which were subjected to NGS sequencing. It has been found, that the sequences of Polish ASFV isolates collected between 2016 and 2017, showed over 99.9% genomic nucleotide similarity to the reference Georgia 2007/1 strain and other related Eurasian strains. Most of the identified variations were represented by single nucleotide polymorphisms (SNP), however the previously unreported 14-nt long insertion representing tandem repeated sequence (TRS) was detected within O174L gene.

Tandem repeats are successfully applied in phylogeographical analyses of ASFV as the 'molecular fingerprints' reflecting its geographical origin. Therefore the analysis of variation usefulness in context of molecular marker was assumed as the next goal of this dissertation. For this purpose, the presence of the non-typical O174L nucleotide sequence pattern has been examined by Sangers' conventional sequencing technique using forty-six DNA samples collected from infected wild boar and pigs from various regions in Poland between

2014 and 2018. The non-typical nucleotide insertion was present in 25 percent of samples, originated mostly from the location neighbouring the borders of Podlaskie, Mazowieckie, Lubuskie voivodships as well as the Belarus. The discovered variation may be applied as a useful tool, providing the potential possibility of ASFV tracking in Poland. Moreover, it has been shown, that this specific mutation appears also in the areas distanced from its primary cluster, what may suggest involvement of human-mediated spread of ASF in Poland. The results obtained in the first stage of this PhD thesis facilitated the selection of representative ASFV isolate for further research focused on virus persistence in different environmental conditions.

During the subsequent part of the studies, the half-life ($T_{1/2}$) and decimal reduction value (D-value) of ASFV in tissues collected from infected pigs were calculated for the selected temperature conditions (-20 , $+4$, $+23^{\circ}\text{C}$). Moreover, a non-linear regression model was developed to predict $T_{1/2}$ in dependence of the temperature. Accordingly to the literature records, ASFV shows high stability in the temperatures below 0°C , nevertheless higher temperatures leads to quicker inactivation of the virus. It was demonstrated, that $T_{1/2}$ at 4°C ranged from 1.94 (95% CI, 1.42–3.08) to 6.3 (95% CI, 5.00–8.55) days, while D-value from 6.46 to 20.95 days. At $+23^{\circ}\text{C}$, ASFV was inactivated rapidly, thus the virus titer in examined samples decreased below the limit of detection after 7 days of incubation. The results of molecular analysis performed by real-time PCR did not correspond to virus titration, and showed high concentration of viral DNA in most of examined samples.

Within the second part of the studies on ASFV persistence, the influence of the environmental conditions on virus survival in temperature above $+4^{\circ}\text{C}$ was analysed. As previously investigated, the temperature of $+23^{\circ}\text{C}$ caused quick decomposition of tissue. Therefore, the ASFV was inactivated during the first 7 days of incubation. The calculated $T_{1/2}$ and D-values reached 0.44 and 1.48 days, respectively. At $+4^{\circ}\text{C}$, the tissues incubated in matrices represented by straw, hay and grain were infectious for at least 56 days. Moreover, the considerable decrease of infectious virus stability was noted in tissues stored in matrices as: a soil, water and leaf litter. Similarly to the previous findings, the results obtained by real-time PCR indicated high content of viral DNA in all samples. This is the first report regarding ASFV persistence in putrefying tissues, thus may be valuable for future risk assessment studies. The obtained results are shedding new light on the current opinion regarding

very high resistance of ASFV to different environmental factors, and demonstrated relatively quick rate of ASFV inactivation during infected carcass decomposition process.