

STRESZCZENIE

Afrykański pomór świń (ASF) to zakaźna choroba wirusowa zwierząt świniowatych (*Suidae*), zwalczana na drodze urzędowej, znajdująca się na liście Światowej Organizacji Zdrowia Zwierząt (OIE). Chorobę wywołuje wirus afrykańskiego pomoru świń (ASFV). Materiał genetyczny ASFV stanowi dwuniciowe DNA, a na podstawie podjętych do tej pory badań rozróżnia się 24 genotypy ASFV. Choroba po raz pierwszy pojawiła się na kontynencie europejskim w latach sześćdziesiątych XX w – za rozwój ówczesnej epizooocji odpowiadał I genotyp wirusa ASFV. W 2007 roku, epizooocja ASF pojawiła się w Europie po raz drugi za sprawą genotypu II wirusa - atakując państwa wschodniej i środkowej Europy, a następnie Azji, przyczyniając się do ogromnych strat ekonomicznych. W Polsce choroba szerzy się konsekwentnie od 2014 roku w populacji dzików, które są naturalnym rezerwuarem wirusa w środowisku, powodując okresowe wybuchy ASF na fermach świń. Brak komercyjnie dostępnej szczepionki przeciw ASF na świecie sprawia, że możliwe jest tylko zapobieganie chorobie poprzez stosowanie zasad bioasekuracji oraz sprawną diagnostykę lekarsko – weterynaryjną i odpowiednie, wcześniejsze minimalizowanie ryzyka wystąpienia i przeniesienia się choroby.

Obecnie panujący na terenie Europy genotyp II wirusa jest przedmiotem badań naukowych na całym świecie, jednakże niewielka ilość informacji dotyczących właściwości chorobotwórczych genotypu II ASFV powoduje potrzebę dokładnego ich poznania. Większość danych dotyczących patogenezy wirusa ASFV to dane pochodzące z badań przeprowadzonych na podstawie innych genotypów wirusa, które mogą różnić się od obecnie występującego w Europie właściwościami chorobotwórczymi - w tym najbardziej interesującą środowisko naukowe patogenezą i odpowiedzią immunologiczną. Jak pokazały obecne badania, objawy kliniczne powodowane przez wirusa ASFV mogą być znacznie zróżnicowane i przyjmować różne formy: od ostrych charakterystycznych dla gorączki krwotocznej po przebiegi subkliniczne, w których ciężko zaobserwować toczącą się chorobę.

Badanie właściwości chorobotwórczych izolatu wirusa ASFV będącego reprezentatywnym genetycznie szczepem dla większości krążących izolatów na danym terenie nie tylko wnosi wartości poznawcze dotyczące przebiegu i patogenezy ASF, ale również może znacząco ułatwić diagnostykę lekarsko – weterynaryjną. Przyczynia się to

się do sprawniejszego zapobiegania chorobie m. in poprzez poznanie: możliwych scenariuszy przebiegu klinicznego, ryzyka związanego siewstwem i poziomem wirusa w poszczególnych matrycach, przydatności diagnostycznej poszczególnych próbek oraz umożliwia wgląd w patogenezę wirusa i jego właściwości immunogenne.

Celem podjętej pracy było poznanie właściwości chorobotwórczych izolatu afrykańskiego pomoru świń pochodzącego z terenu Polski, będącego „reprezentatywnym genetycznie” dla grupy szczepów krążących na terenie kraju.

W ramach realizacji powyższych założeń, w pierwszym etapie badań podjęto się izolacji szczepów afrykańskiego pomoru świń i przeprowadzenie sekwencjonowania genomowego (NGS) izolatów oraz wyselekcjonowanie szczepu genetycznie zbliżonego do jak największej liczby dostępnych sekwencji całogenomowych izolowanych na terenie Polski. Wybrany izolat Pol18_28298_O111 cechował się niskim zróżnicowaniem genetycznym względem innych szczepów pochodzących z terenu kraju. Posiadał charakterystyczny, najbardziej typowy dla tej części Europy wariant II IGR (potrójna insercja TRS) oraz 5 unikalnych różnic genetycznych – charakterystycznych tylko dla szczepów krążących na terenie kraju – w obrębie genów MGF 110-7L, MGF 505-5R, K145R, I267L oraz DP60R.

W drugim etapie badań przeprowadzono donosową infekcję 22 świń rasy wielka biała polska z użyciem wyselekcjonowanego izolatu wirusa – Pol18_28298_O111. Infekcję przeprowadzono na 3 grupach doświadczalnych z użyciem 3 dawek infekcyjnych (1000 HAU (n=8), 500 HAU (n=6) i 5 HAU (n=8)), czwartą grupę zwierząt pozostawiając jako grupę kontrolną (n=6). Infekcję obserwowano we wszystkich grupach doświadczalnych, a najmniejsza spośród dawek (5 HAU) była w stanie zainicjować rozwój choroby w grupie. Określono czas wystąpienia pierwszych objawów klinicznych (okres inkubacji) – ich charakter i nasilenie poprzez zastosowanie punktacyjnej skali „clinical score”. Najkrótszy obserwowany czas inkubacji wyniósł 5 dni, a najdłuższy 20 dni. Prezentowane objawy kliniczne były niespecyficzne (gorączka, apatia). W niektórych przypadkach świnie z gorączką i wykrywalnym wirusem we krwi nadal wykazywały apetyt i normalną aktywność ruchową. Podczas infekcji obserwowano różne formy kliniczne ASF (ostrą, podostrą i chroniczną). W przeciwieństwie do badanych wcześniej innych genotypów wirusa nie obserwowano sinicy uszu, bocznych ścian jamy brzusznej ani towarzyszących jej wybroczyn na powłokach skórnych

Sekcyjnie obserwowano typowe dla ASF objawy kliniczne, wcześniej opisywane przez innych autorów badań, a najczęściej: splenomegalię i powiększenie lub przekrwienie węzłów chłonnych. Obraz histopatologiczny ujawnił deplecję tkanki limfoidalnej oraz przekrwienia i nacieki komórek tkanki limfoidalnej świadczących o toczącym się procesie zapalnym w narządach wewnętrznych.

W trzecim etapie doświadczenia próbki pochodzące od zakażonych zwierząt podlegały badaniom wykrywania obecności wirusowego DNA: określenia czasu pojawiania się materiału genetycznego w celu ustalenia jego siewstwa, poziomu i przydatności diagnostycznej pobranego materiału. Materiał genetyczny ASFV wykrywano we krwi od początku do ostatniego dnia wiremii oraz narządach wewnętrznych – gdzie obserwowano najwyższe poziomy wirusa. Krótko po okresie wiremii (2-3 dni) wirusowe DNA wykrywano w kale i ślinie (siewstwo), przy czym było one wykrywalne punktowo, co może powodować trudności w diagnostyce ASF przy wykorzystaniu próbek pochodzących z wymienionych matryc. Materiał genetyczny wirusa nie był wykrywalny w niektórych narządach wewnętrznych pochodzących od świni wykazującej chroniczną postać ASF. Pośmiertnie wirusowe DNA wykrywano również w moczu i wszystkich pobranych wydzielinach takich jak: płyn z jamy brzusznej, płyn stawowy i płyn z jamy opłucnowej.

Następnie skorelowano czas pojawiania się wirusa w poszczególnych matrycach z prezentowanymi objawami klinicznymi (gorączką). Objawy kliniczne w niektórych przypadkach były obserwowane później niż wiremia, co w połączeniu z pozytywnymi wynikami obecności wirusa w kale i ślinie rodzi ryzyko niewykrycia zakażonych osobników (uznanych za klinicznie zdrowe) i siewstwa zanim zostaną zaobserwowane jakiegokolwiek objawy. Zachowany apetyt i aktywność ruchowa niektórych zakażonych zwierząt może być myląca, szczególnie podczas nadzoru weterynaryjnego nad hodowlami wielkotowarowymi.

W czwartym etapie doświadczenia analizowano wpływ infekcji na parametry morfologiczne krwi oraz wpływ infekcji na funkcje narządów wewnętrznych poprzez monitorowanie poziomów enzymów wskaźnikowych dla poszczególnych profilów narządowych. Ponadto obserwacjom podlegał wskaźnik stanu zapalnego – poziom białka C-reaktywnego (CRP).

Obraz morfologiczny był zróżnicowany zależnie od etapu infekcji. W początkowej fazie u niektórych osobników obserwowano leukocytozę (spowodowaną granulocytozą), w późniejszym etapie infekcja spowodowała zmiany w obrazie morfologicznym krwi ujawniające tendencję do leukopenii i trombocytopenii równocześnie wykazując niewielki wpływ na parametry czerwonych krwinek (erytrocytopenia i spadek stężenia hemoglobiny

we krwi). Zmiany w parametrach biochemicznych krwi obejmowały podwyższony poziom transaminazy asparaginianowej (AST), kinazy kreatynowej (CK), mocznika i kreatyniny. W przebiegu infekcji obserwowano ponadto niewielki wzrost potwierdził obserwowany poziom γ -glutamylotranspeptydazy (GGT) i brak istotnych wahań w poziomie albumin i aminotransferazy alaninowej. Otrzymane wyniki w połączeniu z obrazem patomorfologicznym sugerują niewydolność wielonarządową z zarysowującą się niewydolnością serca i nerek w przebiegu infekcji spowodowanej izolatem Pol18_28298_O111. Poziomy białka CRP przekroczyły normy referencyjne u większości zwierząt (18 z 21) w okresie wiremii, co współgra z obrazem histopatologicznym – obrazem uogólnionego procesu zapalnego, który stoi u podstawy zmian patologicznych i gra kluczową rolę w patogenezie ASF.

W ostatnim etapie prowadzonych badań przeanalizowano podstawowe parametry odpowiedzi immunologicznej w przebiegu infekcji. Przeciwciała przeciw ASF wykryto u 10 osobników, przy czym tylko u 2 osobników, które przeżyły infekcję obserwowano wysokie miana przeciwciał. Analizie poddano średni odsetek populacji limfocytów T i B, w większości wykazując brak istotnych różnic pomiędzy grupą kontrolną a grupami badanymi, aczkolwiek w przebiegu zakażenia dało się zauważyć tendencje spadkowe obu populacji komórek odpowiedzialnych za humoralną i komórkową odpowiedź immunologiczną. W przypadku jednej grupy wykazano istotny spadek odsetka populacji limfocytów T w ostatnim dniu wiremii. Szczegółowa analiza populacji limfocytów T i B dla zwierzęcia, które przeżyło infekcję ASF wykazała wzrost populacji limfocytów T z następowym wzrostem populacji limfocytów B. Powyższe wyniki mogą sugerować zatem, że do efektywnego zwalczania ASF potrzebna jest mobilizacja zarówno odpowiedzi immunologicznej humoralnej jak i komórkowej.

Podsumowując badany izolat Pol18_28298_O111 jest izolatem „reprezentatywnym genetycznie” dla szczepów krążących na terenie Polski. Badany izolat jest szczepem o wysokiej wirulencji i wysokiej zakaźności. W przebiegu ASF powoduje wystąpienie patologicznego stanu zapalnego negatywnie wpływając na funkcję narządów wewnętrznych i parametry krwi obwodowej. Objawy kliniczne powodowane przez izolat są niespecyficzne i mogą być mylące, a siewstwo może następować przed pojawieniem się objawów choroby. Ze względu na poziom wirusa za materiał najwyższego ryzyka należy uznać świeże zwłoki zwierząt, a postępowanie z materiałem zakaźnym powinno odbywać się z zachowaniem restrykcyjnych zasad bioasekuracji

SUMMARY

African swine fever (ASF) caused by the African swine fever virus (ASFV) is an infectious, viral disease of swine (Suidae), officially controlled and listed by the World Organisation for Animal Health (OIE). ASFV belongs to the dsDNA viruses and so far 24 ASFV genotypes were determined. The first occurrence of ASFV in Europe was in 1960s caused by the genotype I of ASFV. In 2007, the ASFV emerged in Europe for the second time. The genotype II of ASFV affected countries of Eastern and Central Europe and Asia, causing enormous economic losses. In Poland the disease is consistently spreading since 2014. From the wild boar population, which is a natural reservoir of the virus, ASF spread to pig population causing seasonal outbreaks. Prevention of the disease is mainly based on biosecurity measures due to the lack of effective and safe vaccine against ASF. Fast and accurate diagnosis made by veterinary service may play a key role for strategy of early recognition of ASF and could prevent spreading of the disease. Knowledge of pathogenic properties of the actually circulating ASFV isolates, not only provides cognitive values on the course and pathogenesis of ASF, but can also significantly contribute to veterinary diagnosis. It facilitates better prevention of the disease by giving an overview of possible scenarios of clinical course, risks associated with virus load and shedding, diagnostic usefulness of individual samples and allows insights into the pathogenesis of the virus and its immunogenic properties.

The aim of this study was to evaluate the pathogenic properties of representative Polish field strain of ASFV.

To cope with the aim of study a group of Polish ASFV field isolates were selected for molecular characterisation by using next generation sequencing. The analyses revealed close genetic relation between majority of Polish strains, and the Pol18_28298_O111 was chosen for further study. Molecular characteristic of Pol18_28298_O111 showed typical variant 2 of IGR (triple insertion of tandem repeat sequence – TRS) and 5 unique for Polish isolates genetic variations (SNP) in following genes: MGF 110-7L, MGF 505-5R, K145R, I267L and DP60R.

In the second stage of the study, an intranasal infection of 22 Polish White Large pigs was performed. The infection was carried out in 3 experimental groups using 3 doses of ASFV (1000 HAU (n=8), 500 HAU (n=6) and 5 HAU (n=8)), while the fourth group of animals was left as the control group (n=6). Infection was observed in all experimental groups. The lowest dose (5 HAU) was also able to initiate infection. Incubation period was determined - character

and severity of clinical signs were evaluated by using the clinical score scale. The shortest observed incubation time was estimated as 5 days and the longest as 20 days. The presented clinical findings were non-specific (fever, apathy). In some cases, infection did not reduce feed intake and apathy wasn't seen. During infection different clinical forms of ASF (acute, subacute and chronic) were observed. In opposite to other virus genotypes, no cyanosis of ears and abdominal area and no petechiae were observed on the skin. The most frequently observed lesions (82%) were: hyperemia and enlargement of lymph nodes and splenomegaly. Depletion of lymphoid tissue and inflammation (hyperemia, lymphocytic infiltration) were found in histopathological survey.

Next step of the study aimed to indicate the risk related to detection of the pathogen, virus load and shedding. In addition correlation between incubation period and detection of genetic material in different matrices was investigated. Detection of ASFV DNA in blood, saliva, faeces, internal organs and urine was carried out. DNA of the ASFV was detected in all blood and internal organs samples (except several internal organs of one pig presenting chronic form of ASF) – these samples presents the highest virus load. Shortly after viremia (2-3 days) genetic material of ASFV was also detectable in oral fluid and faeces, however due to disturbed continuity of detection, these materials seems to be not appropriate for diagnostic purpose of ASF. Viral DNA was also detected *post mortem* in the urine, joint fluid and abdominal exudate. In some cases fever occurred significantly later than presence of ASFV DNA in saliva and faeces, therefore it indicate the risk that clinically healthy - diagnosed pigs may already spread the disease.

The fourth stage of study aimed to evaluate the influence of infection on blood and biochemical parameters as well as levels of C-reactive protein (as indicator of inflammation) were investigated. Results revealed varied response of blood parameters: from leucocytosis to leucopenia depending of the infection period. Tendency for thrombocytopenia and mild erythrocytopenia as well as anaemia was observed. Changes in blood biochemical parameters included elevated levels of aspartate transaminase (AST), creatine kinase (CK), urea and creatinine. In the course of infection, a slight increase was also confirmed in the level of γ -glutamyltranspeptidase (GGT). There were no changes in the levels of albumin and alanine aminotransferase. The results together with the pathomorphological observations suggest multi-organ failure with heart and kidney failure. CRP protein levels exceeded the reference standards in most of animals (18 of 21) during the viremia, which is consistent with the histopathological findings – a general inflammatory process, that plays a key role in the pathogenesis of ASF.

The last stage of research, included investigation of the immune response's basic parameters. 10 animals were found to be seropositive, however only 2 of them were survivors presenting high level of antibody titers. The average percentage of T and B lymphocyte populations was analysed, mostly showing no significant differences between the control group and the study groups. Nevertheless, in the course of infection a decreasing tendency of both populations of cells responsible for humoral and cell immune response could be seen. One group showed a significant decrease in the percentage of T lymphocyte population on the last day of viremia. Detailed analysis of the T and B lymphocyte population for the chosen survivor pig showed an increase in the T lymphocyte population followed by an increase in the B lymphocyte population. Therefore the abovementioned results may suggest that mobilization of both humoral and cellular immune response is needed to effectively combat ASF.

In conclusion, the studied isolate Pol18_28298_O111 is a "genetically representative" isolate for strains circulating in Poland. The tested isolate is highly virulent and high infective. The clinical symptoms caused by the isolate are non-specific - can be confusing, and shedding can occur before the recognition of disease symptoms. In the course of ASF, it causes pathological inflammation, negatively affecting the function of internal organs and peripheral blood parameters. Due to the level of virus, carcasses should be considered as the highest risk material, and should be handled and disposed according to high biosecurity standards.