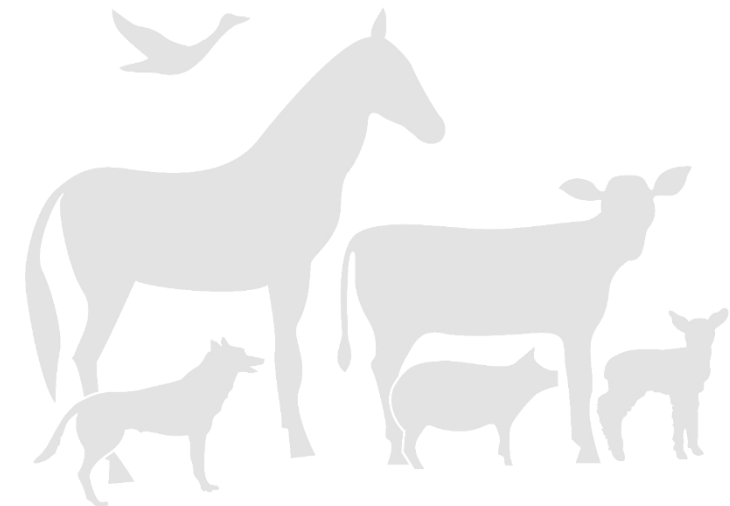


Rola krajowego laboratorium referencyjnego ds. ASF
PIWet-PIB w Puławach w badaniach naukowych nad wirusem
ASF i epizootologią afrykańskiego pomoru świń.



Krzysztof Niemczuk, Anna Szczotka - Bochniarz, Maciej Frant

Postanowieniem Nr 2/2021 Przewodniczącego Międzyresortowego Zespołu do spraw łagodzenia skutków związanych z wystąpieniem przypadków afrykańskiego pomoru świń z dnia 21 maja 2021 r., powołano grupę roboczą ds. zintensyfikowania badań naukowych nad wirusem afrykańskiego pomoru świń.



Krajowe Laboratorium referencyjne ds. ASF

Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 17 maja 2002r.

w sprawie wykazu laboratoriów referencyjnych właściwych dla poszczególnych rodzajów i kierunków badań.

EURL ds. ASF, Valdeolmos Hiszpania

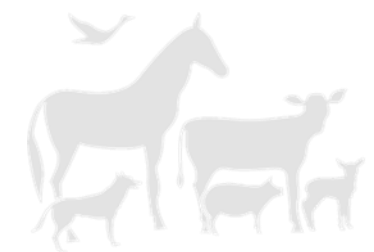


Funkcja naukowa i zadania KLR ds. ASF w PIWet-PIB

- badania genetycznie nad wirusem ASF (ASFV) oraz możliwościami opracowania w przyszłości skutecznej szczepionki przeciwko ASF;
- badania nad epizootologią ASF, w tym prognozy rozwoju sytuacji w zakresie ASF w Polsce;
- badanie przeżywalności wirusa ASF w zależności od różnych warunków otoczenia i w przypadku ewentualnego zanieczyszczenia wirusem płodów rolnych;
- badania nad opracowaniem innowacyjnych systemów diagnostyki ASF – szybkie wykrywanie wirusa;



Szczepionka



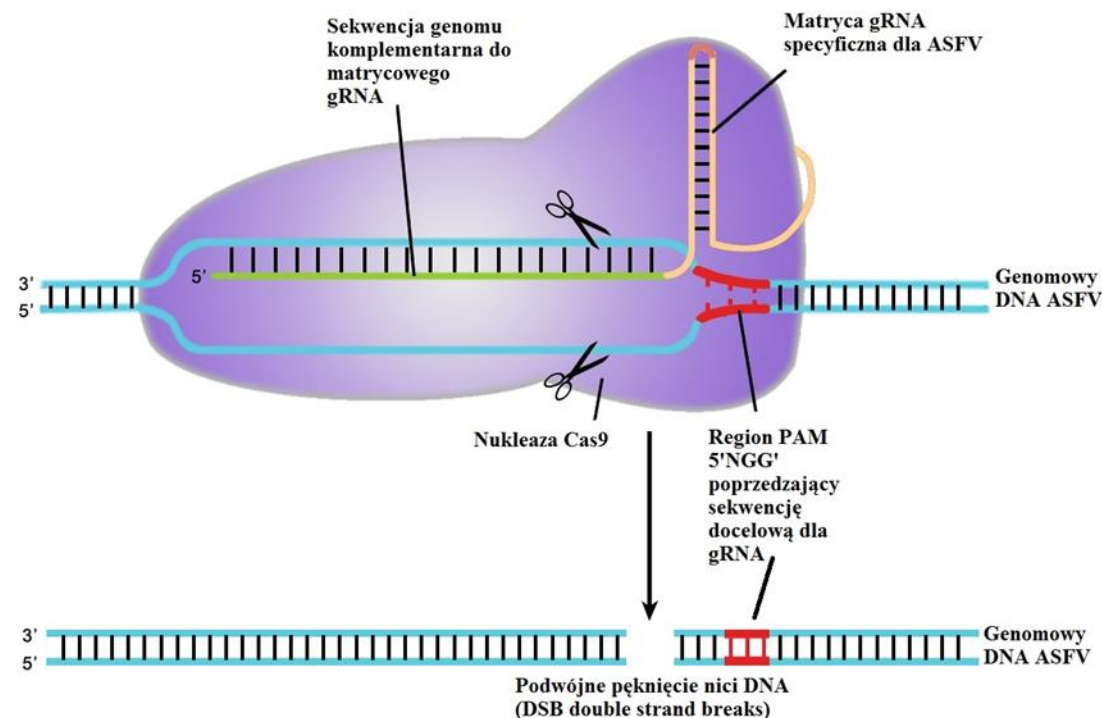
- ✓ badania genetycznie nad wirusem ASF (ASFV) oraz możliwościami opracowania w przyszłości skutecznej szczepionki przeciwko ASF



Ukierunkowany knock-out 3 genów (A238L, 9-GL i EP402R) w kontekście żywej atenuowanej szczepionki.

Immunizacja świń mutantami delecyjnymi genów EP-402R i 9-GL zapewniła ochronę przeciwko infekcji szczepami rodzicielskimi. Białko A238L pełni funkcję immunomodulacyjną.

Badania wykonywane w Instytucie mają na celu ocenę właściwości biologicznych rekombinowanego szczepu ASFV pozbawionego określonych genów (A238L, EP402R i 9GL). W ramach podjętych badań zastosowano innowacyjną technikę CRISPR/Cas9 (regularnie zgrupowanych i oddzielonych krótkich sekwencji palindromowych), stanowiącą obecnie najbardziej nowoczesne i efektywne narzędzie inżynierii genetycznej



Uzyskane dane z przebiegu patogenezy ASF stanowią bardzo istotny wkład w zrozumienie kolejnych faz choroby. Niezwykle interesujące jest „ozdrowienie” świni zakażonej ASFV. Może być to wynikiem uruchomienia u niej na skutek niepoznanych czynników odpowiedzi typu komórkowego, bądź też spontaniczną mutacją genetyczną wirusa użytego do zakażenia świń, która spowodowała osłabienie jego własności patogennych.



Opracowanie szczepionki przeciwko ASF, jest tak bardzo skomplikowane, ponieważ w odporności komórkowej przeciwko ASFV zasadnicze znaczenie mają limfocyty T (szczególnie limfocyty T cytotoksyczne – TCD8+) i komórki NK (natural killers), czyli naturalni zabójcy. W przebiegu zakażenia ASFV systemy odpowiedzi typu komórkowego ulegają rozregulowaniu. Wirusowe systemy unikania odpowiedzi immunologicznej gospodarza polegają m.in. na synergistycznym działaniu białek kodowanych przez regiony A238L, EP402R i 9GL. Dodatkowo w procesy „ucieczki” przed rozpoznaniem wirusa ASF przez układ immunologiczny świni czy dzika włączone są również inne białka o niewyjaśnionej dotąd funkcji biologicznej, dotychczas zidentyfikowano ich ponad 130.

HORIZON 2020? – potencjalna międzynarodowa współpraca nad szczepionką przeciwko ASF

Aktualnie PIWet-PIB prowadzi rozmowy nad potencjalną współpracą z ośrodkami badawczymi z Hiszpanii i Danii oraz firmami komercyjnymi z Francji i Bułgarii odnośnie wspólnego projektu (**HORIZON2020**) dotyczącego szczepionki przeciwko ASF, **spełniającej zasadę DIVA**.

Rozmowy są w toku.



Wnioski:

- opracowany rekombinowany szczep wirusa ASF Pol18_28298_0111 pozbawiony określonych genów wykazywał zmniejszoną patogenność dla świń, jednakże nie pozwala na zapewnienie pełnej protekcji poszczepiennej.
- uzyskane wyniki wskazują na możliwy przebieg ostry, nadostry i chroniczny ASF u zakażonych świń po zakażeniu zjadliwym szczepem wirusa ASFV Pol18_28298_0111.
- konieczna jest dalsza kontynuacja badań, które pozwolą na konstrukcję szczepu ASF pozbawionego dodatkowo genów 286L i K145R a następnie wprowadzenie dodatkowego „markera” genetycznego pozwalającego na zastosowanie strategii DIVA (odróżniania zwierząt szczepionych od zakażonych).



badania epizootiologiczne, w tym prognozy rozwoju
sytuacji w zakresie ASF w Polsce.

- ✓ badania epizootologiczne, w tym prognozy rozwoju sytuacji w zakresie ASF w Polsce.

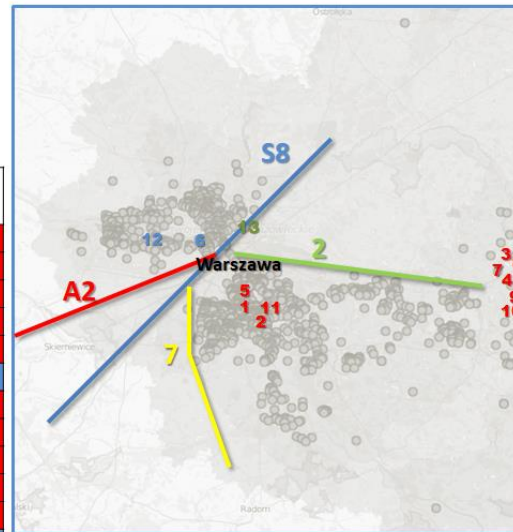
Sekwencje kompletnych genomów izolatów ASFV z Polski

99.91%-99.95% podobieństwa do Georgia 2007/1, Kashino 04/13, Odintsovo 02/2014

```

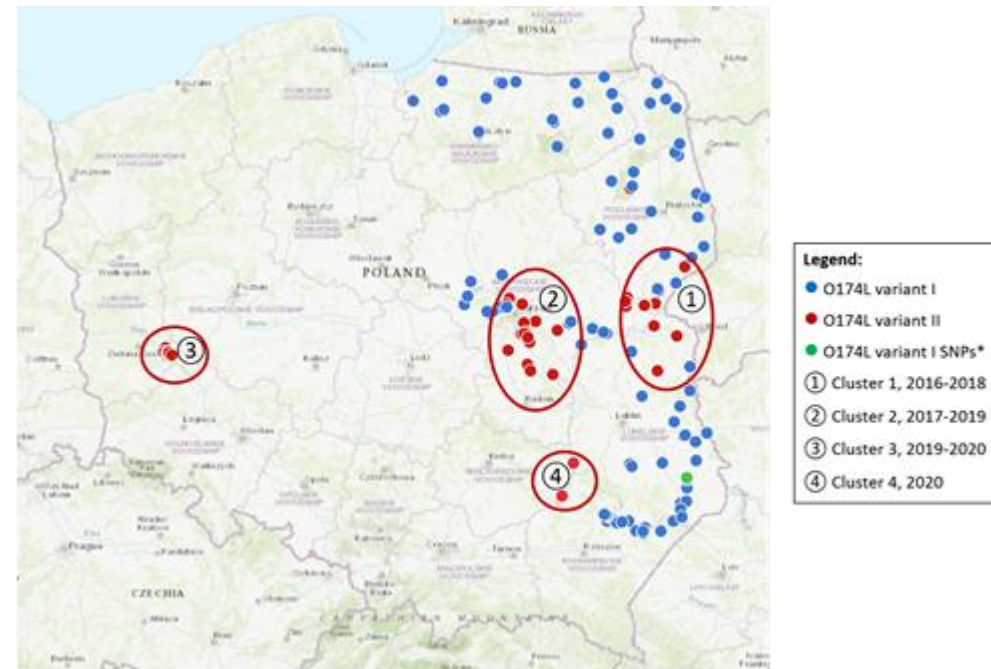
Georgia 2007/1 - O174L
128,264 128,263 128,262 128,278 128,269 1
TAAAAA TCAC TAC TGAAAAA CAC TAC AAAAA AAC TTA TAAAGAA TTAGGAT T
Pol_17_58449-1_C921 TAAAAA TCAC TAC TGAAAAA CAC TAC AAAAA AAC TTA TAAAGAA TTAGGAT T
Pol_17_58887_C756 TAAAAA TCAC TAC TGAAAAA CAC TAC AAAAA AAC TTA TAAAGAA TTAGGAT T
Pol_17_56193_C800 TAAAAA TCAC TAC TGAAAAA CAC TAC AAAAA AAC TTA TAAAGAA TTAGGAT T
Pol_17_58444_C923 TAAAAA TCAC TAC TGAAAAA CAC TAC AAAAA AAC TTA TAAAGAA TTAGGAT T
Pol_17_58449-3_C921 TAAAAA TCAC TAC TGAAAAA CAC TAC AAAAA AAC TTA TAAAGAA TTAGGAT T
Pol_17_56192_C799 TAAAAA TCAC TAC TGAAAAA CAC TAC AAAAA AAC TTA TAAAGAA TTAGGAT T
Pol_17_58449-4_C921 TAAAAA TCAC TAC TGAAAAA CAC TAC AAAAA AAC TTA TAAAGAA TTAGGAT T
Pol_17_58449-5_C921 TAAAAA TCAC TAC TGAAAAA CAC TAC AAAAA AAC TTA TAAAGAA TTAGGAT T
Pol_17_58230_C730 TAAAAA TCAC TAC TGAAAAA CAC TAC AAAAA AAC TTA TAAAGAA TTAGGAT T
Pol_16_00662_C968 TAAAAA TCAC TAC TGAAAAA CAC TAC AAAAA AAC TTA TAAAGAA TTAGGAT T
Pol_17_58573_C932 TAAAAA TCAC TAC TGAAAAA CAC TAC AAAAA AAC TTA TAAAGAA TTAGGAT T
Pol_17_58456_C792 TAAAAA TCAC TAC TGAAAAA CAC TAC AAAAA AAC TTA TAAAGAA TTAGGAT T
Pol_17_58256_C918 TAAAAA TCAC TAC TGAAAAA CAC TAC AAAAA AAC TTA TAAAGAA TTAGGAT T
  
```

Lp	Rok	Miesiąc	Kod próbki	Numer przypadku	Powiat	Obecność mutacji
1	2017	Grudzień	55230	730	Piaseczno	+
2	2017	Grudzień	55887	756	Piaseczno	+
3	2017	Grudzień	56192	799	Siedlce	+
4	2017	Grudzień	56193	800	Siedlce	+
5	2017	Grudzień	56458	792	Piaseczno	+
6	2017	Grudzień	58258	918	Warszawa Zachodnia	-
7	2017	Grudzień	58449-1	921	Siedlce	+
8	2017	Grudzień	58449-3	921	Siedlce	+
9	2017	Grudzień	58449-4	921	Siedlce	+
10	2017	Grudzień	58449-5	921	Siedlce	+
11	2017	Grudzień	58544	923	Piaseczno	+
12	2017	Grudzień	58573	932	Warszawa Zachodnia	-
13	2018	Styczeń	00662	958	Wołomin	+

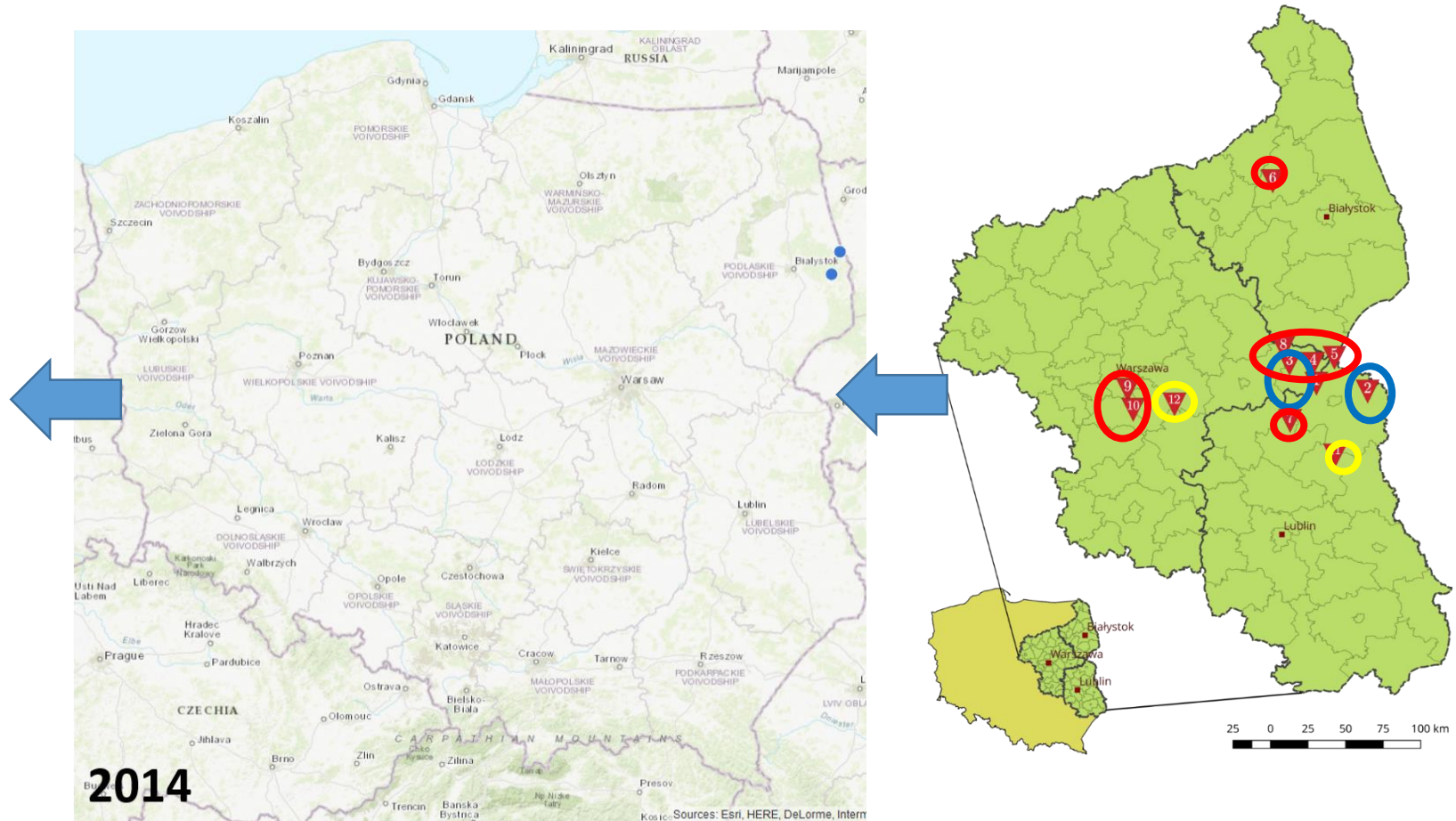
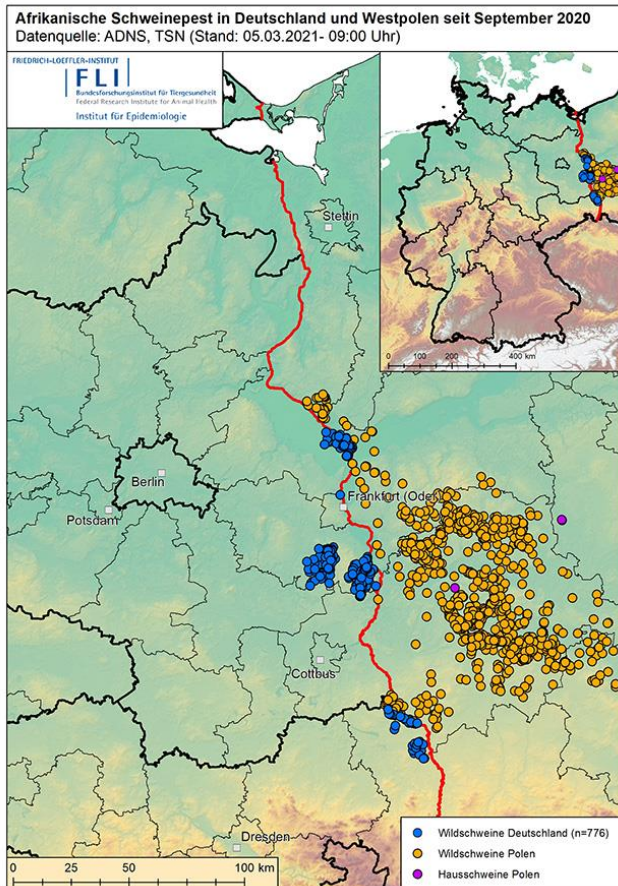


Powyższe badania mogą pomóc w wyjaśnieniu pochodzenia wirusa ASF w ogniskach choroby w gospodarstwach trzody chlewnej.

Uzyskane wyniki badań molekularnych wskazują na możliwość śledzenia podobieństwa genetycznego izolatów ASFV z ognisk i przypadków ASF w Polsce i w krajach, w których występuje ta choroba. W obrębie genomu ASFV stwierdzono obecność charakterystycznej mutacji (insercji 14 nukleotydów) w obrębie genu O174L kodującego polimerazę DNA wirusa ASFV

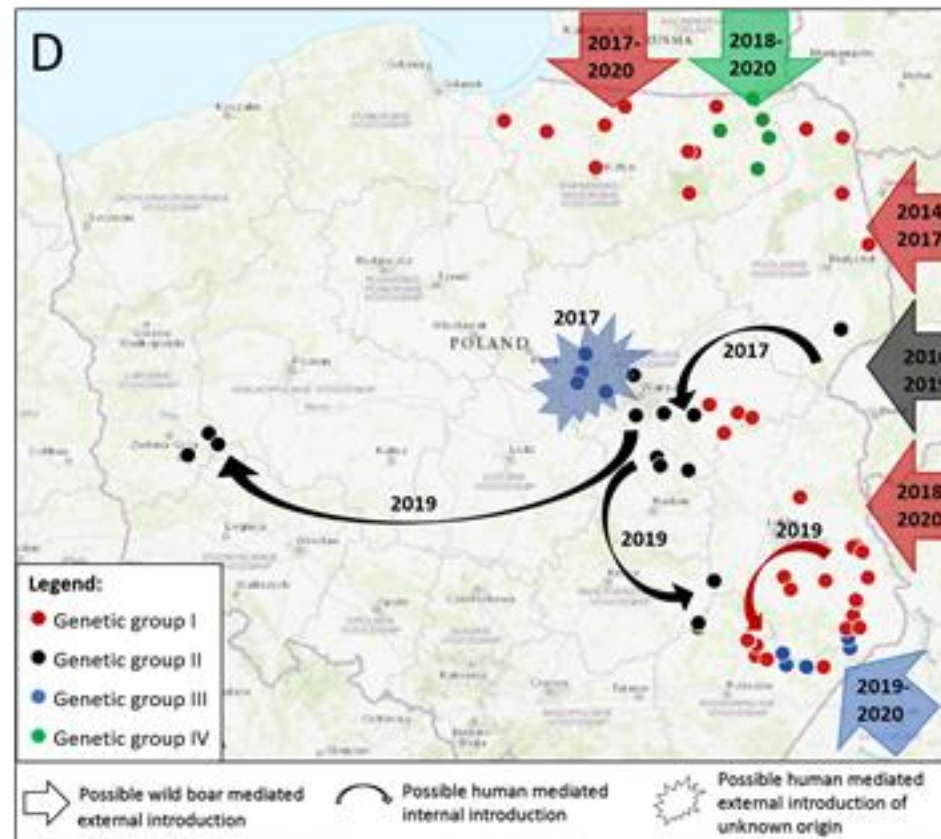


- ✓ Sekwencje kompletnych genomów izolatów ASFV z Polski, pozwala na śledzenie „migracji” wirusa ze wchodu Polski (granica z Białorusią, wrzesień 2016) do Niemiec (wrzesień 2020): gen O174L



- Niebieski kolor rok 2016
- Czerwony kolor rok 2017
- Żółty kolor 2018

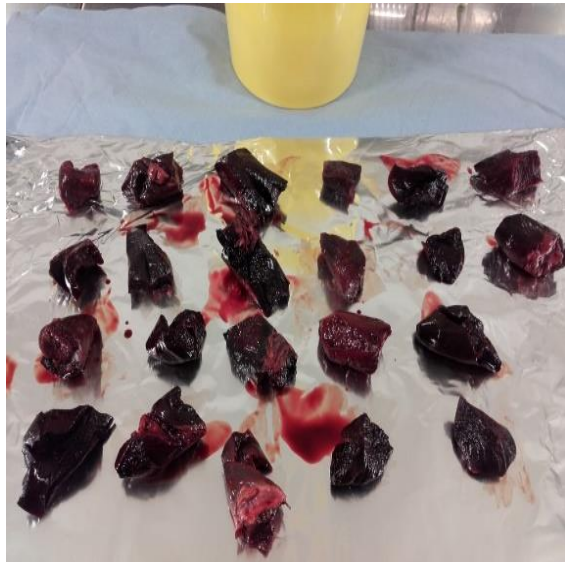
Prawdopodobne scenariusze szerzenia się ASF na terenie kraju w poszczególnych latach. Grubymi strzałkami zaznaczono drogi naturalnej introdukcji (wędrówka dzików) poszczególnych wariantów wirusa do Polski. Cienkimi strzałkami oznaczono drogi prawdopodobnych dróg rozwleczenia choroby przez człowieka w obrębie kraju. Gwiazdą oznaczono prawdopodobne zawleczenie choroby przez człowieka spoza kraju (dokładne pochodzenie trudne do oszacowania).



Wnioski

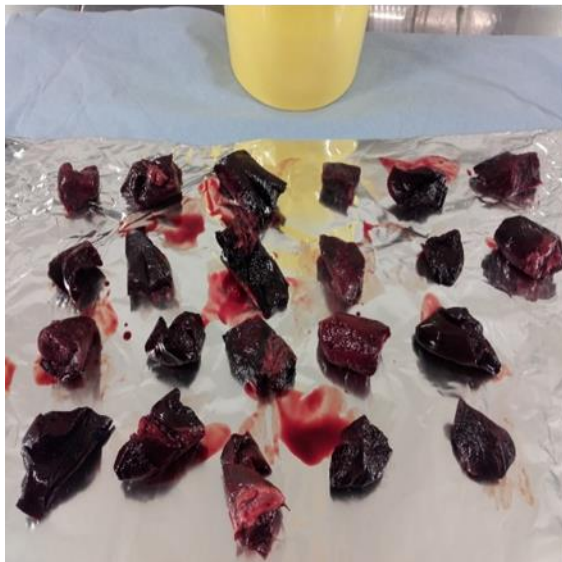
- przeprowadzone badania filogenetyczne szczepów wirusa ASF izolowanych w Polsce na podstawie genu O174L, K145R oraz MGF 505-5R, a także regionu międzygenowego IGR I73R/I329L wskazują na niezależną introdukcję wirusa z Obwodu Kaliningradzkiego w 2017 i 2018 roku, z terenu Białorusi w latach 2014-2017 oraz z terenu Ukrainy w latach 2018-2020.
- pod względem genetycznym szczep wirusa ASF stwierdzony na terenie Wielkopolski w 2019 roku jest najbardziej zbliżony do szczepów izolowanych w latach 2017-2019 w woj. mazowieckim – na terenie pow. piaseczyńskiego. Fakt ten może wskazywać na działalność człowieka w szerzeniu się ASF w Polsce.

- ✓ badanie przeżywalności wirusa ASF w zależności od różnych warunków otoczenia i w przypadku ewentualnego zanieczyszczenia wirusem produktów rolnych



Badania te miały na celu wyznaczenie okresu półtrwania ($T_{1/2}$) oraz wskaźnika 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.

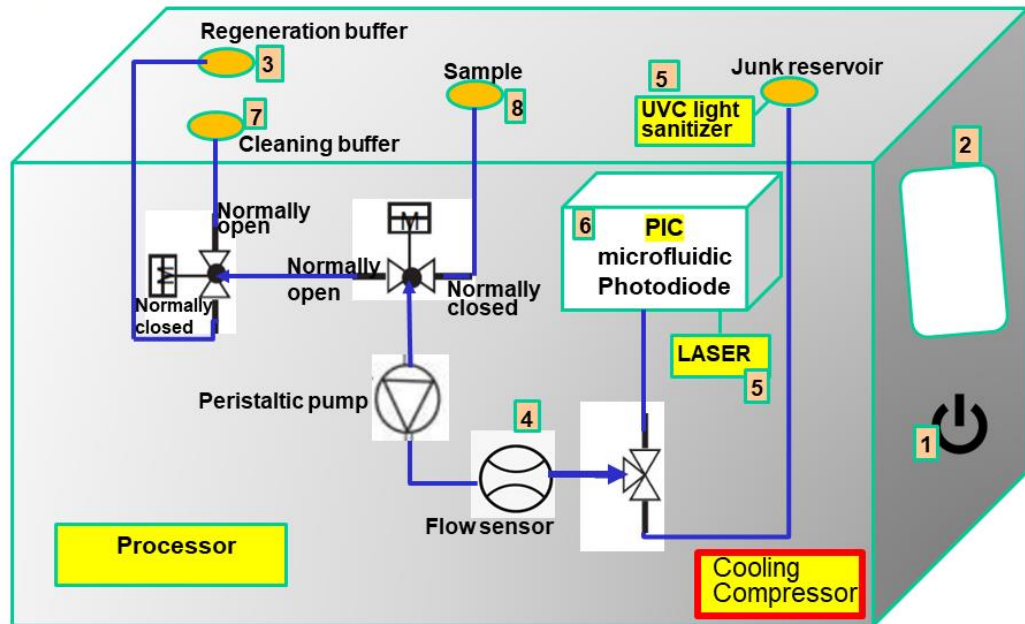


Wnioski

- 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 wirusa ASF na warunki środowiska i dowodzą szybkiego tempa inaktywacji wirusa w naturalnie rozkładających się tkankach padłych zwierząt.

✓ badania na nad opracowaniem innowacyjnych systemów diagnostyki

ASF = szybkie wykrywanie wirusa



Industrialization:

- Automated cartridge insertion process
- Protection case

Re-designed cartridge:

- PIC, RR distribution
- Fluidics distribution
- Micro-spotting for RR functionalization
- Cartridge self-contained, no fluids on base-station

Electronics:

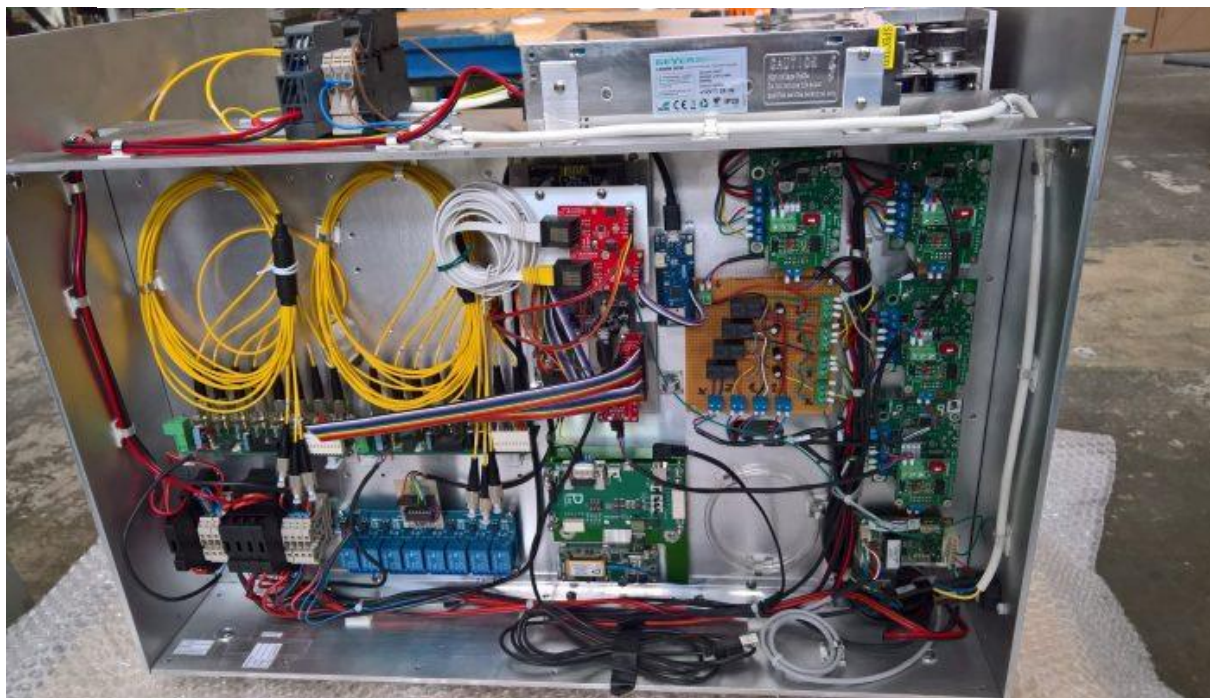
- Specific Industrial power supply.
- Battery feature added

Software:

- Improved interface
- Communication server added

Electronics system control:

- Fluidics control and optical system control
- Communication added to the electronics board



Design and Development of Photonic Biosensors For Swine Viral Diseases Detection

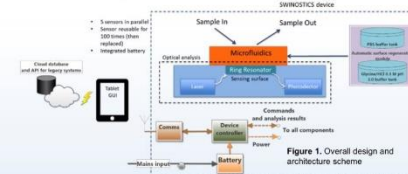
Gyula Balak¹, Amadeu Griol², Sergio Perani³, Manuel Rodrigo³, Juan Hurtado², Laurent Bellieres², Teodora Ivanova², David Zurita², Carles Sánchez³, Sara Recuero³, Alejandro Hernández³, Santiago Simón³, Ioannis Bossis⁴, Alessandro Capo⁵, Alessandra Camarca⁵, Sabato D'Auria⁵, Antonio Varriale⁶ and Alessandro Giusti⁶



www.swinostics.eu
 www.facebook.com/swinostics/
 www.linkedin.com/company/18392774
 www.twitter.com/swinostics

BACKGROUND

The H2020 SWINOSTICS project aims to develop a novel field diagnostic device, based on advanced, proven, bio-sensing and photonics technologies (Figure 1) to detect emerging and endemic viruses causing epidemics in swine farms



OBJECTIVES

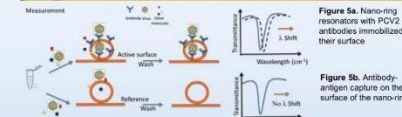
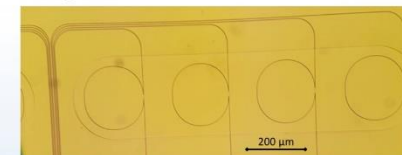
Fabrication of a photonic integrated circuit (PIC) to detect of PCV2 by the use of a commercially available polyclonal antibody (Thermo Fisher Scientific Cat. No.: PA-534969)

PIC DESIGN AND FABRICATION

The biosensors were fabricated on Si_3N_4 6" wafers, comprised of a top layer of 300 nm of Si_3N_4 deposited by LPCVD (low chemical vapor deposition) on a 3.26 μm thick layer of thermal SiO_2 (Figure 2)

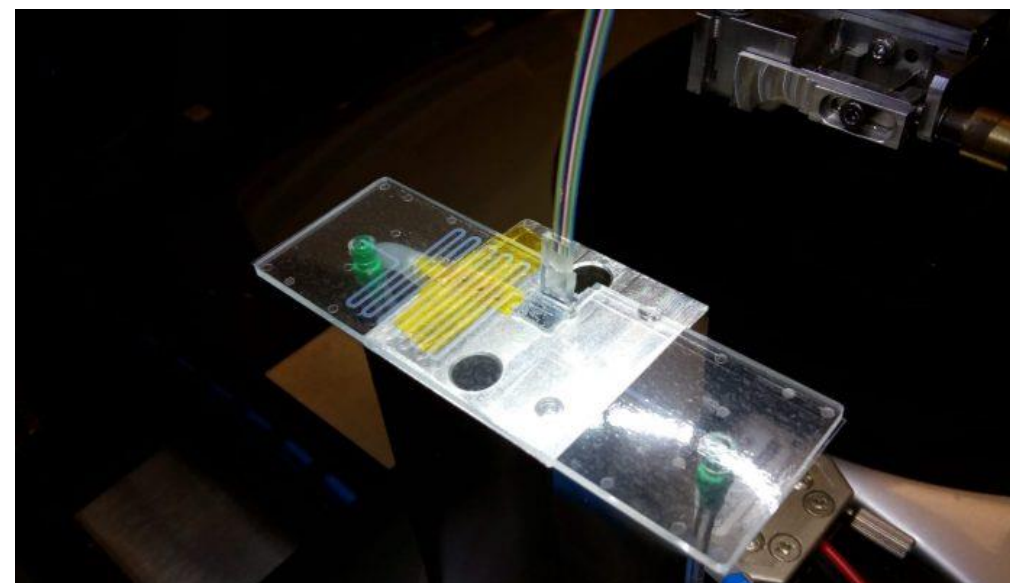
FUNCTIONAL ELEMENTS OF THE PIC

Ring resonators (Figure 5a, b) – the surface was first oxidized, then silanized and treated with a mix of carbodiimide and N-hydroxysuccinimide to ensure the oriented, covalent bind of the antibodies by their carboxy terminal on the Fc part of the immunoglobulins



OPTICAL CHARACTERIZATION OF THE FUNCTIONALIZED PICS

PCV2b cell culture supernatant (qPCR Ct: 10) was used in serial PBS dilutions to test the functionalized PIC. Anti PCV2 antibodies



1. Etap testy prototypu w Atenach:
2. Drugi etap: testy prototypu we Włoszech w Polsce i na Węgrzech





- System do szybkiej diagnostyki chorób świń: **PRRS, CSF, PPV, PCV2, SIV oraz ASF**
- Wykrywanie antygenów wirusów w próbkach śliny, surowicy oraz innych tkankach.
- Ocena laboratoryjna sprzętu w Atenach udowodniła jego skuteczność w wykrywaniu wszystkich analizowanych patogenów w próbkach śliny.
- Planowane testy laboratoryjne w PIWet-PIB Puławy: **lipiec-sierpień 2021.**



THE CONSORTIUM

ACADEMIC PARTNERS

- UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA
- Centro de Tecnología Nanofotónica de Valencia
- Institute of Food Sciences National Research Council of Italy
- PIWet
- AGRICULTURAL UNIVERSITY OF ATHENS
- ÁLLATORVOSTUDOMÁNYI EGYETEM · BUDAPEST
- UNIVERSITÀ DEGLI STUDI FIRENZE
DISPAA

INDUSTRIAL PARTNERS

- LUMENSIA sensors
- CyRIC
- KON TOR 40
- ISS BioSense
Innovation in Optical Biosensors

www.swinostics.eu



SWINE diseases field diagNoSTICS toolbox

SWINOSTICS
SWINE diseases field diagNoSTICS toolbox



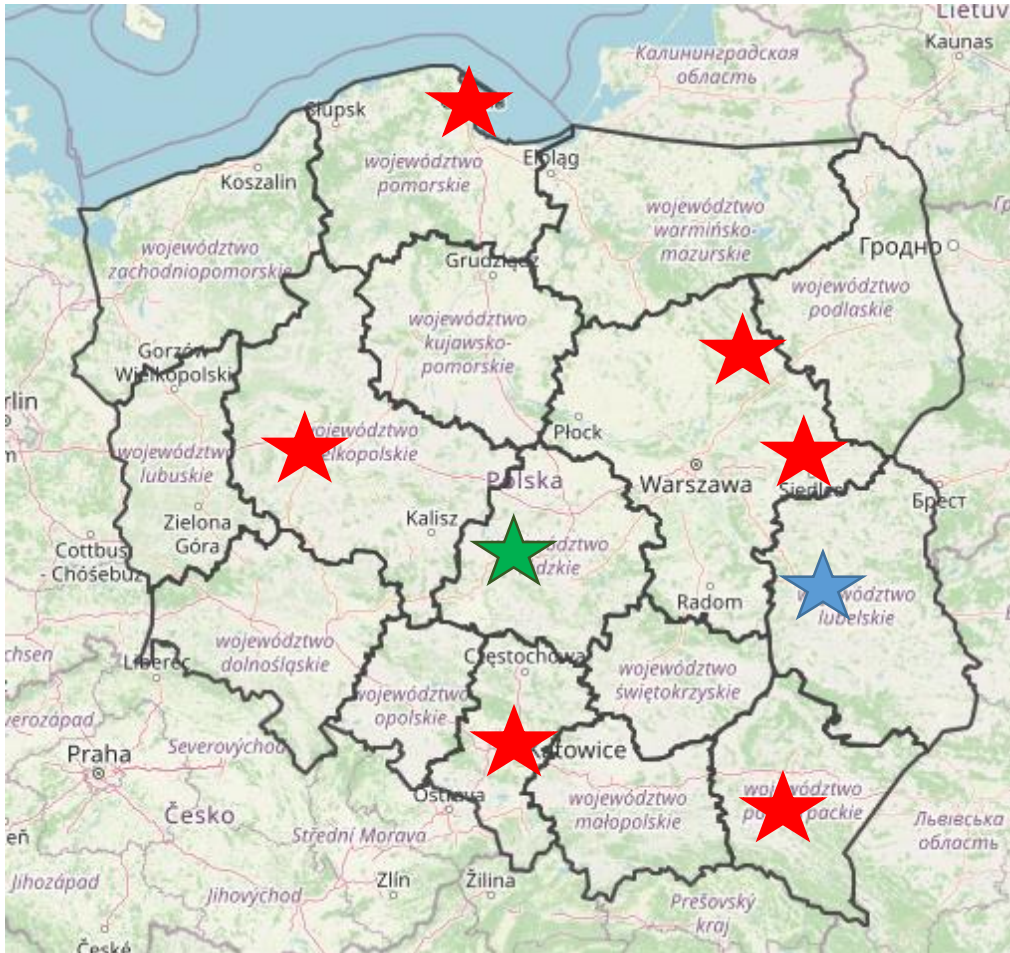
European Commission




This project has received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No 771649

www.swinostics.eu

Diagnostyka ASF w Polsce



-  KLR ds. ASF PIWet-PIB Puławy
-  Zakład Pryszczycy PIWet-PIB w Zduńskiej Woli
-  Wyznaczone laboratoria ZHW



KLR ds. ASF PIWet-PIB Puławy

Warto wspomnieć, iż dotychczas w KLR ds. ASF w PIWet PIB w Puławach opracowano 3 innowacyjne techniki diagnostyki ASF, takie jak: amplifikacja krzyżowa kwasów nukleinowych w warunkach stałej temperatury (CPA), łańcuchowa reakcja spiralno-krzyżowa (PCLSR) oraz modyfikacje techniki amplifikacji w warunkach stałej temperatury (LAMP). 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.

Wnioski

- podjęte i kontynuowane w KLR ds. ASF w PIWet-PIB badania mają na celu doskonalenie diagnostyki ASF oraz innych chorób zakaźnych świń z wykorzystaniem nowoczesnych i szybkich testów molekularnych, pozwalających na wykonanie wstępnych badań obecności wirusa w warunkach „przy pacjencie/zwierzęciu” ang. „on-site”.
- współpraca międzynarodowa KLR ds. ASF w PIWet-PIB z wiodącymi ośrodkami naukowymi na świecie pozwala na określenie przydatności opracowanych testów diagnostycznych w zróżnicowanych warunkach laboratoryjnych.

- ✓ badania nad możliwym udziałem owadów, głównie much z rodzin bąkowatych (*Tabanidae*), kuczmanów (*Culicoides*), oraz much z rodzaju *Stomoxys* jako możliwego wektora wirusa ASF;



Celem podjętych badań jest ustalenie roli owadów z rodziny bąkowatych (Tabanidae), Bolimuszki kleparki (*Stomoxys calcitrans*), komarowatych (Culicidae) oraz kuczmanowatych (Chironomoidea) w potencjalnym szerzeniu się wirusa afrykańskiego pomoru świń (ASFV) w populacji dzików oraz świń domowych na terenie kraju.

Najważniejszym źródłem ASF w Polsce i innych krajach Europy Wschodniej dotkniętych problemem ASF były i są w dalszym ciągu zakażone dziki (wektor i rezerwuar) oraz w szczególności szczątki tych padłych zwierząt, w których wirus pozostaje zakaźny od kilku tygodni do kilku lat.

Pomimo pilotażowych badań wykonanych na terenie Estonii a także eksperymentalnych w Danii, dotychczas nie wyjaśniono jednoznacznie potencjalnej roli owadów w szerzeniu się ASFV w hodowli trzody chlewnej.

Wnioski:

- muchy oraz inne owady z rodziny muchówek czy „bąkowatych” nie stanowią obecnie wektora w szerzeniu się ASF na terenie Polski.
- podjęte dotychczas w PIWet-PIB badania wskazują, że rola wymienionych rodzin owadów w szerzeniu się ASF w kraju i Europie Wschodniej jest raczej wątpliwa;
- zaistniała sytuacja może się jednak zmienić, dlatego też wymagany jest ciągły monitoring w tym zakresie.

Planowane rozwinięcie projektu: EFSA + Litwa + Rumunia +Polska

- Entomological survey to study the possible involvement of arthropod vectors in the transmission of African swine fever virus
- Badanie próbek owadów: bolimuszki kleparki oraz kuczmanów na obecność DNA wirusa ASF
- Wstępne badania w Rumunii potwierdziły obecność DNA ASFV w analizowanych owadach.
- Do tej pory nie udało się wyizolować „żywego” wirusa z próbek owadzich.
- **PIWet-PIB podejmie próbę izolacji wirusa ASFV z próbek owadzich z Polski, Rumunii oraz Litwy.**



- ✓ ocena skuteczności środków dezynfekcyjnych wykorzystywanych w „walce z ASF”



Celem podjętych badań jest ustalenie skuteczności substancji aktywnych zawartych w popularnych środkach dezynfekcyjnych rekomendowanych do stosowania w hodowli trzody chlewnej.

Preparat uznaje się za skuteczny, jeśli spowodował redukcję miana wirusa o przynajmniej 4 log₁₀, co oznacza inaktywację 99.99% początkowego miana ASFV.

Obecnie prowadzone są badania nad ekstraktami roślinnymi i ich wykorzystaniem w obszarze dezynfekcji przeciwko wirusowi ASF. Jest to innowacyjne rozwiązanie, które docelowo zapewni skuteczną dezynfekcję, bezpieczne warunki stosowania zarówno dla ludzi jak i zwierząt, jak również ochronę środowiska przed degradacyjnym działaniem chemicznych środków dezynfekcyjnych.

Przebadano 14 ekstraktów roślinnych w trzech różnych stężeniach i dwóch różnych warunkach zabrudzenia każdy :

- Ekstrakt z nasion Aronii
- Ekstrakt z nasion Truskawki
- Ekstrakt z nasion Maliny
- Ekstrakt z nasion Porzeczki Czarnej
- Ekstrakt z Tymianku
- Ekstrakt ze Skrzypu
- Ekstrakt z Mięty
- Ekstrakt z Pokrzywy
- Ekstrakt z Aloesu
- Ekstrakt z Kozieradki
- Ekstrakt z Wąkroty Azjatyckiej
- Ekstrakt z Limonki
- Ekstrakt z Melisy
- Ekstrakt z Ogórka



**Na obecnym etapie badań
3 ekstrakty wykazały
działanie wirusobójcze
przeciwko ASFV**

Wg PIWet-PIB skuteczna walka z ASF obejmuje następujące obszary działań:

- ✓ redukcja populacji dzików – planowa gospodarka łowiecka, odstrzał sanitarny, rozwiązania specustawy
- ✓ identyfikacja dzików padłych
- ✓ wdrażania i przestrzeganie zasad bioasekuracji (gospodarstwa hodowlane, myśliwi, lekarze weterynarii, i inni)
- ✓ konfiskata żywności nielegalnie wwożonej na terytorium RP

Dziękuję za uwagę

