

# Wybrane dane prezentowane podczas 25. Kongresu IPVS. Część II. Podejście genetyczne do zwalczania chorób oraz nowe strategie w diagnostyce laboratoryjnej

Małgorzata Pomorska-Mól

z Katedry Nauk Przedklinicznych i Chorób Zakaźnych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu

Zagadnieniem, któremu poświęcono sporo uwagi na 25. Kongresie IPVS, było podejście genetyczne do zwalczania chorób świń. Stałe problemy ze zwalczaniem wielu jednostek chorobowych, pojawiające się nowe oraz ogromny rozwój biologii molekularnej i genetyki powodują, że naukowcy mogą szukać innych niż do tej pory rozwiązań w zakresie kontroli i zwalczania chorób. Jedną z takich metod są próby uzyskania zwierząt niepodatnych na zakażenie danym patogenem. Podczas kongresu zaprezentowano wyniki dotyczące wirusa zespołu rozrodczego i oddechowego (PRRSV) i *Actinonobacillus pleuropneumoniae*.

Obecnie najbardziej zaawansowane badania w tym zakresie dotyczą PRRS. Zespół rozrodczo-oddechowy świń jest panzootyczną chorobą zakaźną świń, powodującą poważne straty ekonomiczne niemal na całym świecie. Choroba manifestuje się inaczej u świń w różnym wieku, ale powoduje przede wszystkim późne poronienia i rodzenie się martwych płodów oraz zaburzenia ze strony układu oddechowego u prosiąt. Czynnikiem sprawczym PRRS jest wirus RNA o bardzo wąskim tropizmie do komórek gospodarza (komórek linii monocytów/makrofagów). Znajdujący się na nich receptor CD163 został uznany za miejsce fuzji wirusa z komórką. CD163 ulega silnej ekspresji zwłaszcza na powierzchni makrofagów płucnych. Ten wąski tropizm wirusa wykorzystano do stworzenia zwierząt pozbawionych wrażliwości na zakażenie poprzez usunięcie fragmentu (regionu SRCR5) receptora CD163, do tego celu zastosowano technikę CRISPR/Cas9.

Decyjne makrofagi wykazały całkowitą odporność na zakażenie wirusem PRRSV (brak replikacji różnych genotypów PRRSV). W badaniach uwzględniono genotyp 1 PRRSV, podtypy 1, 2 i 3 oraz genotyp 2 PRRSV. Uzyskane wyniki potwierdzono w badaniach *in vivo* na świniach, które okazały się całkowicie odporne na zakażenie wysoce zjadliwym izolatem PRRSV. Usunięcie regionu SRCR5 nie spowodowało żadnych działań niepożądanych i ubocznych u świń utrzymywanych w standardowych warunkach hodowlanych. Miały normalne tempo wzrostu, prawidłowe wartości parametrów hematologicznych, brak wpływu na funkcje makrofagów oraz receptora CD163. Badania przy użyciu mikroskopii konfokalnej wykazały brak replikujących się cząstek wirusa w makrofagach decyjalnych. Wskazuje to na zahamowanie zakażenia na etapie wnikania/fuzji otoczki wirusa lub stadium enkapsydacji wirusa. W czasie kongresu podkreślano, że zwierzęta uzyskane w ten sposób to nie są zwierzęta transgeniczne

## Selected data presented at the 25<sup>th</sup> IPVS Congress. Part II. Genetic approach to disease control and new strategies in laboratory diagnostics

Pomorska-Mól M., Department of Preclinical Sciences and Infectious Diseases, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Poznań University of Life Sciences

The aim of this article was to present and characterize papers from the 25<sup>th</sup> International Pig Veterinary Society Congress, that took place in Chongqing, China, from 11 to 14 June 2018, concerning part, which relates to genetic approach to disease control and new strategies in laboratory diagnostics. In conclusion, the data presented in lectures regarding genetic approach to disease control revealed that it is possible to obtain animals genetically resistant for various pathogens. In relation to new strategies in laboratory diagnostics, the new kind of specimen (processing fluid), has been identified as reliable and accurate for laboratory diagnostic procedures and for monitoring of swine infectious diseases.

**Keywords:** swine, infectious diseases, genetic resistance, laboratory diagnosis, processing fluid.

(GMO). Niestety sytuacja w tym zakresie uległa zmianie w lipcu 2018 r., kiedy to sąd Komisji Europejskiej orzekł, że zastosowanie techniki CRISPR/Cas9 prowadzi do wytworzenia organizmów modyfikowanych genetycznie. Decyzja ta może w istotnym stopniu wpłynąć na badania w tym obszarze prowadzone w państwach Unii Europejskiej.

Kolejny patogen, z którego zwalczaniem wciąż mamy ogromny problem, to *A. pleuropneumoniae* wywołujący pleuropneumonię świń. Ponieważ, jak przynajmniej nawet największe autorytety w zakresie pleuropneumonii świń, w tym prof. Marcelo Gottschalk (o czym zresztą także mówił na Kongresie IPVS), wciąż mamy problem ze zwalczaniem tej choroby, która może generować olbrzymie straty ekonomiczne, naukowcy stale poszukują możliwości poprawy sytuacji w zakresie kontroli czy minimalizowania strat powodowanych przez pleuropneumonię. Leczenie antybiotykami, podobnie jak szczepienia, zapewnia jedynie pewien stopień ochrony przed niekorzystnymi zjawiskami związanymi z chorobą, ponadto antybiotyki często nie mogą osiągnąć stężeń terapeutycznych, np. w migdałkach. Szczepienie natomiast ma ograniczoną skuteczność ze względu na niską odporność krzyżową pomiędzy serotypami. Dlatego odporność warunkowana genetycznie byłaby potencjalnie cenną alternatywą dla obecnie stosowanych metod.

Doktor Hoeltig z Uniwersytetu w Hanowerze zaprezentowała na Kongresie w Chinach najnowsze wyniki projektu PleuroRes. Jego celem jest poszukiwanie genetycznych markerów oporności świń na *A. pleuropneumoniae*. Badania przeprowadzono na 165 swniach landrace. 37 świń najbardziej wrażliwych lub odpornych na zakażenie *A. pleuropneumoniae* zostało wyselekcjonowanych do dalszych badań (genotypowanie, sekwencjonowanie). Projekt aktualnie jest na bardzo wczesnym etapie realizacji, jednak już teraz udało się zidentyfikować 3 geny kandydujące do genetycznej selekcji świń mniej podatnych na pleuropneumonię, tym samym potwierdzono tło genetyczne podatności na zakażenie. Potrzebne są dalsze prace w celu zbadania rozpowszechnienia korzystnych i niekorzystnych wariantów genów u różnych ras i populacji oraz w celu zweryfikowania uzyskanych wyników.

Kolejnym elementem poruszonym podczas obrad było nowatorskie podejście do diagnostyki laboratoryjnej niektórych chorób. Badania laboratoryjne często stanowią podstawowe i ostateczne narzędzie rozpoznawania chorób zakaźnych. Ciągły rozwój nauki i nowe zdobycze wiedzy na temat patogenezy wielu chorób przyczyniają się do znacznego postępu w tej dziedzinie oraz otwierają możliwości nie tylko w zakresie wykorzystania nowych technik, ale także wykorzystania nowych próbek w diagnostyce chorób. Przedstawione podczas kongresu wyniki badań dotyczyły zarówno udoskonalania już istniejących metod, jak i wdrażania nowych technik do diagnostyki chorób świń. Nie zabrakło również informacji dotyczących nowego podejścia do pobierania próbek (4).

Zgodnie z najnowszymi trendami przy pobieraniu próbek do badań dąży się do wykorzystania materiału, który stanowi niejako produkt uboczny różnych rutynowo wykonywanych na fermie czynności, takich jak: kastracja lub przycinanie ogonków, albo też wykorzystuje się tzw. próbki środowiskowe.

Takim nowatorskim materiałem jest tzw. płyn technologiczny lub zabiegowy (processing fluid), który, jak się okazuje, można z powodzeniem wykorzystywać do diagnostyki monitorowania chorób. Procedura pozyskiwania płynu technologicznego jest bardzo prosta i polega na otrzymaniu płynu pochodzącego z ogonków i jąder, pozyskanych podczas rutynowych czynności skracania ogonków i kastrowania, do jednego pojemnika/wiadra wyłożonego workiem foliowym/plastikową torbą i gazą, które są zamocowane wokół górnej części wiadra gumową opaską. Płyny z tkanek przesiąkają przez gazę do worka. Zgromadzony w ten sposób płyn może być wykorzystany diagnostycznie (przelany do probówek i wysłany do odpowiedniego laboratorium). Zastosowanie płynu technologicznego w diagnostyce i monitorowaniu chorób ma szereg zalet. Największą jest możliwość zwiększenia reprezentatywności próbki i częstotliwości pobierania próbek do badań bez zwiększania nakładów pracy czy kosztów. Ponadto ważna jest możliwość uzyskania próbek od bardzo młodych świń, od których bardzo trudno jest pozyskać inny rodzaj próbek, np. płyn ustny lub krew.

Porównanie przydatności nowych metod pobierania próbek do diagnostyki zespołu rozrodczo-oddechowego

świń (PRRS) przedstawione zostało przez Vilalta i wsp. (3). Badania wykonano na fermie loch, w której niedawno miał miejsce wybuch PRRS (PRRSV, genotyp 2). Pobieranie pierwszych próbek miało miejsce 2 tygodnie po stwierdzeniu faktu introdukcji PRRSV do stada. Kolejne pobierania próbek były prowadzone co 3 tygodnie, przez okres 24 tygodni. Próbkę pobierano od 3-dniowych prosiąt z 10 miotów. Do badań laboratoryjnych pobierano: płyn technologiczny (PT), wymazy ze skóry gruczołu mlekowego loch, wymazy środowiskowe oraz indywidualne próbki krwi od prosiąt (materiał odniesienia). W przeprowadzonym doświadczeniu miot uznawano za PRRSV-dodatni, gdy co najmniej jedno prosię było dodatnie na podstawie badań surowicy. W przypadku płynu technologicznego czułość (czyli zdolność do wykrycia osobnika prawdziwie dodatniego) wynosiła 83%, natomiast specyficzność (prawidłowe wykluczenie choroby) 92%, wyniki odniesiono do wyników w surowicy, która była tzw. złotym standardem. W przypadku wymazów ze skóry gruczołu mlekowego parametry te były nawet wyższe, jednak RNA PRRSV wykrywane było do 3 miesięcy po wybuchu choroby w stadzie. W przypadku płynu technologicznego okres detekcji wynosił prawie 6 miesięcy, dzięki czemu może on być z powodzeniem wykorzystywany nie tylko do diagnostyki, ale i do monitoringu choroby w stadach. W wyniku badania płynu technologicznego uzyskano 4 wyniki fałszywie dodatnie i cztery fałszywie ujemne. W surowicy prosiąt z wynikiem fałszywie ujemnym stwierdzono jedynie niewielkie ilości wirusa (wysokie Ct). Wyniki fałszywie dodatnie mogą być konsekwencją kontaminacji płynu technologicznego np. w środowisku fermy. Podsumowując, płyn technologiczny dawał wyniki dodatnie nawet wtedy, gdy tylko jedno prosię w miocie było dodatnie – stanowi więc wygodną i czułą matrycę analityczną w ocenie sytuacji epidemiologicznej w miocie i stadzie. Wyniki przedstawionych badań wskazują jednocześnie, że zarówno jądra, jak i ogonki mogą stanowić źródło wirusa, dlatego też ich usuwanie powinno się odbywać z zachowaniem należytej ostrożności, aby zapobiec szerzeniu się zakażenia.

Dużą zaletą, zwłaszcza w badaniach naukowych, jest możliwość wykorzystania płynu technologicznego także do izolacji PRRSV. Tym tematem zajął się kolejny zespół amerykański (1). Doktor Lopez przedstawił analizę wykorzystania diagnostycznego płynu technologicznego w stadach o bardzo niskiej prevalencji PRRSV. Do doświadczeń terenowych skłoniły ich wyniki badań wstępnych, które wykazały, że badanie płynu technologicznego ma wyższą czułość (zdolność do wykrycia świń PRRSV dodatnich) niż badanie 30 indywidualnych próbek krwi lub wymazów z kikutów ogonków (pulowanych po 5). W badaniach porównano 2 rodzaje próbek: płyn technologiczny i wymazy krwi z kikuta ogonka. Badania przeprowadzono w 5 stadach produkujących prosięta (w tym jedno stado negatywne jako kontrola). Do badań laboratoryjnych pobierano 20 zestawów próbek, pobranych od tej samej grupy prosiąt w tym samym czasie. Były to: płyn technologiczny od partii 250–710 prosiąt, 30 wymazów z krwi ogonowej (po 5) i 30 surowic. Próbkę badano testem rRT-PCR oraz testem ELISA (IDEXX PRRS X3 ELISA). Wykazano, że

objętość płynu technologicznego pozwala na wykonanie wielokierunkowej diagnostyki. Odsetek próbek pozytywnych uzyskanych w badaniu płynu technologicznego istotnie przewyższał ten uzyskany w badaniu wymazów z ogonków. Udało się ponadto wykonać sekwencjonowanie wirusa z 4 próbek płynu technologicznego. Ponadto potwierdzono przydatność płynu technologicznego jako matrycy umożliwiającej oznaczenie przeciwciał przy wykorzystaniu dostępnych na rynku testów ELISA. Ustalono, że płyn technologiczny najlepiej jest schłodzić lub zamrozić jak najszybciej po pobraniu. Wstępne wyniki wskazują, że przechowywanie płynu technologicznego w lodówce do 5 dni oraz jednorazowe rozmrożenie nie obniżają jego wartości diagnostycznej (brak różnic w wynikach PCR).

Możliwości wykorzystania płynu technologicznego w diagnostyce PRRS (genotyp 1) ocenili także naukowcy z Holandii (2). Zbadali oni efektywność płynu technologicznego w wykrywaniu PRRSV w stadzie świeżo zakażonym genotypem 1 wirusa. Równocześnie pobierali płyn technologiczny oraz próbki surowicy od 4 grup prosiąt w odstępach tygodniowych. W każdej grupie pobierano jedną zbiorczą próbkę płynu technologicznego oraz 30 próbek krwi (pulowano je po pięć). Materiał przebadano testem PCR. Wyniki uzyskane z surowicy potwierdziły, że wszystkie 4 partie prosiąt były PRRSV dodatnie, natomiast na podstawie wyników badań płynu technologicznego jedynie 3 z 4 partii prosiąt uznano za dodatnie. Probki surowicy charakteryzowały się więc wyższą czułością diagnostyczną, ale dużo mniejszy nakład pracy oraz istotnie niższe koszty badań w odniesieniu do płynu technologicznego wskazują, że jest on alternatywą wartą rozważenia.

Podsumowując, wstępne dane z badań, także terenowych, wskazują, że płyn technologiczny jest bardzo dobrą matrycą do badań, wykazującą szereg zalet, do których należy zaliczyć: łatwe pobranie, niskie koszty (pobrania i badań), możliwość zbadania większej liczby zwierząt jednocześnie (jedna próbka od 700 sztuk), możliwość częstego pobierania próbek. Wszystko to może przyczynić się do usprawnienia monitoringu, zwłaszcza w przypadku zakażeń o niskiej prevalencji. Diagnostyka na bazie próbek płynu technologicznego wydaje się więc prostym i wygodnym sposobem monitoringu statusu stada w zakresie PRRSV (praktyczna, szybka, efektywna) oraz krążenia wirusa w stadzie. Materiał ten może być szczególnie przydatny podczas uwalniania stad od PRRSV.

Zaskakujące badania zaplanowali i wykonali badacze z USA. Naukowcy postanowili zbadać, czy płyn technologiczny można wykorzystać również do diagnostyki innych chorób świń, jak choćby endemicznych zakażeń bakteryjnych powodowanych przez *Mycoplasma hyopneumoniae*. Była to niezwykle interesująca próba, jeśli się weźmie pod uwagę, że patogen ten jest uważany za powodujący zakażenie jedynie w układzie oddechowym, a w przebiegu choroby nie mamy do czynienia z ogólnym krążeniem zarazka. Do tej pory w diagnostyce *M. hyopneumoniae* wykorzystywano próbki pochodzące z górnych i dolnych dróg oddechowych. W przedstawionym doświadczeniu wykorzystano 21 próbek płynu technologicznego ze stada o potwierdzonym dodatnim statusie w odniesieniu do

zakażeń *M. hyopneumoniae*, w którym jednocześnie nie obserwowano klinicznych objawów zakażenia. Próbkę przebadano testem real-time PCR. Wyniki badań były zaskoczeniem nawet dla samych inicjatorów badań. Okazało się, że w odniesieniu do 38% (8/21) próbek uzyskane wyniki były dodatnie. Wyniki dodatnie były częstsze u miotów pierworódek niż wieloródek. Badania powtórzono na kilku innych fermach zakażonych *M. hyopneumoniae* i zawsze wykrywano obecność patogenu w płynie technologicznym. W stadzie wolnym od *M. hyopneumoniae* płyn technologiczny był ujemny. Jak podkreślają autorzy badania, te wstępne wyniki są sprzeczne z dotychczasową wiedzą na temat patogeny zakażeń *M. hyopneumoniae* i konieczne jest przeprowadzenie dalszych badań, które rozwieją wątpliwości dotyczące tego, czy bakteria ta była rzeczywiście obecna w płynie technologicznym, czy była to tylko kontaminacja środowiskowa, a może brak precyzji w badaniach laboratoryjnych.

## Piśmiennictwo

1. Lopez W., Johnson C., Angulo J., Linhares D., Zimmerman J.: PRRS virus detection at near-zero prevalence in neonatal piglets using processing fluid samples and applications for monitoring. *Proceedings of 25<sup>th</sup> International Pig Veterinary Society Congress*, Chongqing, China, 2018, 100.
2. Sol R., Jansen R.: The use of processing fluids compared to serum for determination the PRRS type 1 status of neonatal piglets on a commercial Dutch farm. *Proceedings of 25<sup>th</sup> International Pig Veterinary Society Congress*, Chongqing, China, 2018, 166.
3. Vilalta C., Sanhuesa J., Torremorell M., Morrison R.: New strategies for sampling piglets. *Proceedings of 25<sup>th</sup> International Pig Veterinary Society Congress*, Chongqing, China, 168.
4. Dors A., Sprawka K., Gawęda E., Czyżewska-Dors E.: Nowoczesne badania laboratoryjne w rozpoznawaniu zakaźnych chorób świń. *Lecznica Dużych Zwierząt Monografia: Echa Kongresów ESPHM i IPVS*, 2018, 68–73.
5. Burkard Ch., Opriessnig T., Mileham A.J., Stadejek T., Ait-Ali T., Lillo S., Whitelaw C.B., Archibald A.L.: Gene edited pigs are resistant to PRRSV infection whilst maintaining biological function of the editing target gene CD163. *Proceedings of 25<sup>th</sup> International Pig Veterinary Society Congress*, Chongqing, China, 118.
6. Hoeltig D., Nietfeld F., Willems H., Fries R., Wurmser Ch., Valentin-Weigand P., Waldmann K.H., Reiner G.: PleuroRes: Identification of genetic markers associated with enhanced resistance to porcine. *Proceedings of 25<sup>th</sup> International Pig Veterinary Society Congress*, Chongqing, China, 2018, 198.
7. Gottschalk M.: *Actinobacillus pleuropneumoniae*: why do we still have problems to control the disease? *Proceedings of 25<sup>th</sup> International Pig Veterinary Society Congress*, Chongqing, China, 2018, 029.

Prof. dr hab. Małgorzata Pomorska-Mól,  
e-mail: mpomorska@up.poznan.pl