

Szczepionka przeciwko afrykańskiemu pomorowi świń

Zygmunt Pejsak, Marian Trusczyński

Zakład Chorób Świń Państwowego Instytutu Badawczego – Państwowego Instytutu Weterynaryjnego w Puławach

Coraz szybciej szerząca się epidemia afrykańskiego pomoru świń (ASF), szczególnie w populacji dzików, we wszystkich krajach dotkniętych tą chorobą, w tym w Polsce, uwidacznia, że jej zwalczanie zwłaszcza w populacji zwierząt wolno żyjących jest przedsięwzięciem niezwykle trudnym. Doświadczenia związane ze zwalczaniem klasycznego pomoru świń (CSF) w populacji dzików w Niemczech czy wścieklizny u lisów wskazują, że dopiero zastosowanie odpowiednich szczepionek pozwoliło na skuteczne rozwiązanie problemu szerzenia się tych chorób. Wydaje się, że także w przypadku ASF do przełomu w zakresie zwalczania choroby, przede wszystkim w populacji dzików, dojdzie dopiero po uzyskaniu skutecznej szczepionki.

Celem tego artykułu przeglądownego jest przedstawienie stanu badań nad szczepionką przeciw ASF w powiązaniu z mechanizmami odporności przeciwwzakaźnej, określanej też jako odporność ochronna. Głównym źródłem odnośnych informacji jest dokument roboczy Dyrektoriatu Generalnego Zdrowia i Bezpieczeństwa Żywności Komisji Europejskiej z 31 stycznia 2017 r. (1).

African swine fever vaccine

Pejsak Z., Trusczyński M., Department of Swine Diseases, National Veterinary Research Institute, Pulawy

Information on the present epidemic situation of African swine fever (ASF) in Europe, including Poland, during the years 2014-2018 is shortly characterized, underlining the spread of the disease to the west direction. The actual scenario of controlling ASF would be supported by effective and safe vaccines but such products are not available yet. Having this in mind, the state of knowledge necessary to develop a vaccine is presented. The value of inactivated vaccines, subunit vaccines and live vaccines with attenuated strains of ASF is defined. It has been concluded that the best choice would be offered by live, attenuated vaccine containing recombinant, highly immunogenic strain of ASFV, free from causing post-vaccinal complications. Simultaneously, a reliable DIVA test enabling differentiation of vaccinated from infected pigs or wild boar should be developed. The vaccines for domestic swine and for wild boar should be elaborated as soon as possible. It is difficult however, to predict the availability of such products.

Keywords: African swine fever, vaccine, pigs, wild boar.

Jak wynika z tego opracowania oraz innych zawartych w nim publikacji, do chwili obecnej nie udało się uzyskać w pełni skutecznej i niewywołującej powikłań poszczepiennych szczepionki, która mogłaby być uznana urzędowo jako nadająca się do użytku terenowego.

Ważną tego przyczyną jest niedostateczne poznanie u poszczególnych szczepów ASFV zależnej od genów genomu danego szczepu swoistości poszczególnych antygenów uodporniających, czego rezultatem może być niepełna homologia w tym względzie między antygenami szczepów szczepionkowych i szczepów wywołujących ASF u danej świni.

W przypadku ASF, podobnie jak w innych chorobach zakaźnych, odporność przeciwwzakaźna obejmuje odpowiedź immunologiczną humoralną i komórkową (2). Odnośnie do pierwszej wykazano, że parenteralne podanie świniom surowicy od świń, które przeżyły zakażenie wirusem ASF, chroniło je przed zakażeniem zjadliwym homologicznym antygenowo szczepem ASFV, a znacznie rzadziej szczepem heterologicznym w stosunku do poprzedniego. U świń zakażonych, które wcześniej otrzymywały surowicę od ozdrowieńców, obserwowano opóźnienie w pojawianiu się objawów klinicznych i mniejszą intensywność oraz zmniejszenie poziomu wirēmii (3). W odporności komórkowej przeciw ASFV zasadnicze znaczenie mają limfocyty T i komórki NK (natural killers), czyli naturalni zabójcy (2), jak również komórki T CD8 (4, 5).

Wobec braku urzędowo zarejestrowanej szczepionki przeciw ASF, która w strategii zwalczania tej choroby mogłaby odegrać znaczącą rolę, aktualnie w zwalczaniu choroby pozostaje jedynie jak najwcześniejsze kliniczne, sekcyjne i laboratoryjne rozpoznanie choroby, wybijanie całych stad świń, w których są osobniki zakażone ASFV, oraz stosowanie w szerokim zakresie bioasekuracji i urzędowych zarządzeń dotyczących zwalczania ASF. Bliższe dane na ten temat znajdują się we wcześniej opublikowanych polskojęzycznych pracach oraz obszernym piśmiennictwie zagranicznym, do którego dołączają publikacje dotyczące zwalczania ASF u dzików, będących najgroźniejszym rezerwuarem ASFV. Nie ma wątpliwości, że potrzeba dysponowania bardzo dobrą szczepionką jest szczególnie ważne, w odniesieniu do dzików. Chodzi tu przede wszystkim o szczepionkę doustną.

W ostatnich latach wiele grup badaczy na całym świecie zajmowało się opracowywaniem technologii produkcji szczepionek z wirusem ASF inaktywowanym metodami fizycznymi i chemicznymi; szczepionek podjednostkowych oraz szczepionek ze szczepami ASFV atenuowanymi, czyli pozbawionymi w dużym stopniu właściwości chorobotwórczych, przy zachowaniu właściwości uodporniających.

Szczepionki inaktywowane, nawet z dodatkiem adiuwantu, okazały się nieskuteczne w wywoływaniu u świń odporności przeciwwzakaźnej przeciwko ASFV (6). Przypuszcza się, że przyczyną tego jest złożoność wirusa, który zawiera ponad 50 różnych białek, oraz fakt istnienia dwóch postaci infekcyjnych ASFV: jednej wewnątrzkomórkowej oraz drugiej zewnątrzkomórkowej.

Szczepionki podjednostkowe zawierają uzyskane w bakulowirusie białka ASFV: p72, p54 i p30. Podczas gdy preparaty z białkami p54 i p30 wywoływały u immunizowanych świń znaczącą ochronę przed

zakażeniem szczepem E75 ASFV, to połączenia białek p54 + p30 + 72 uzyskane w bakulowirusie nie chroniły uodpornianych świń przed zakażeniem szczepem Malawi ASFV (1, 7). Sprzeczne wyniki wymienionych doświadczeń, mogą być związane z użytym szczepem ASFV, chociaż ostatnie wyniki badań szczepionek podjednostkowych z DNA kodującym p54 i p30 nie doprowadziły do ochrony przed letalnym zakażeniem ASFV o symbolu E75 ani indukcji swoistych przeciwciał neutralizujących.

Z cytowanych prac dotyczących szczepionek podjednostkowych przeciw ASF wynika, że ta grupa biopreparatów indukuje u szczepionych nimi świń odpowiedź immunologiczną przeciw ASFV, w tym pojawienie się swoistych przeciwciał i/lub swoistych komórek T, jednak uzyskana ochrona przeciwwzakaźna nie chroni przed zakażeniem (8). Uzasadnione są jednak dalsze badania nad tą grupą biopreparatów przeciw ASF zmierzające do zwiększenia ich immunogenności, bowiem dotychczas uzyskane podjednostkowe szczepionki nie spełniają wymogów ich urzędowej rejestracji.

Żywe, atenuowane szczepionki występują w dwóch odmianach: a) jako preparaty ze szczepami ASFV o niskiej zjadliwości, czyli naturalnie atenuowanymi i b) jako preparaty zawierające ASFV pozbawiony w znacznym stopniu zjadliwości, dzięki zastosowaniu techniki inżynierii genetycznej, eliminującej, w procesie delecji, z genomu wirusa geny determinujące zjadliwość. Wymienione jako pierwsze preparaty stosowano we wczesnych latach 60. XX w. do zwalczania ASF w Portugalii i Hiszpanii. Ze względu jednak na częste powikłania poszczepienne, włącznie z zejściami śmiertelnymi, szczepionki z tej grupy zostały wycofane z użycia w zwalczaniu ASF w wymienionych krajach, a potem nigdy nie były stosowane. Szczepionki należące do drugiej grupy były i nadal są przedmiotem licznych badań mających na celu uzyskanie szczepionek modyfikowanych genetycznie w kierunku znacznego obniżenia ich chorobotwórczości poprzez usuwanie z genomu genów determinujących tę właściwość. Badania genetyczne zmierzają również do konstruowania genomu ASFV szczepu szczepionkowego, tak aby zawierał geny determinujące ekspresję wysoce immunogennych antygenów uodporniających nie tylko w układach homologicznych, lecz również heterologicznych, gdyż szczególnie w drugim przypadku szczepy szczepionkowe obecnie oceniane cechują się zbyt niską immunogennością.

Z przedstawionych danych wynika, że szczepionki z rekombinowanymi szczepami szczepionkowymi wydają się najbardziej obiecującymi biopreparatami do zastosowania w zwalczaniu ASF, pod warunkiem zwiększenia ich immunogenności, zwłaszcza w układach heterologicznych, oczywiście równocześnie z innymi strategiami zwalczania, o których wspomniano uprzednio. Dodatkowym, niezbędnym warunkiem urzędowej rejestracji skutecznych i nieszkodliwych szczepionek jest dysponowanie techniką DIVA, umożliwiającą odróżnienie świń i dzików szczepionych przeciwko ASF od zwierząt zakażonych wirusem. Szczepionki takie stosowano w programie zwalczania choroby Aujeszkyego. Trudno określić, kiedy wymienione wymogi odnośnie do ASF zostaną w pełni zrealizowane, natomiast intensyfikacja badań w tej dziedzinie w pełni

uzasadnia ponoszenie ogromnych nakładów na tego typu badania, wobec strat wywołanych przez ASFV.

W kolejności omówione zostaną istniejące niejasności i luki w odniesieniu do szczepionek z żywymi atenuowanymi szczepami ASFV. Pozostałe scharakteryzowane rodzaje szczepionek mają małe szanse, aby mogły być zarejestrowane do użytku terenowego. W nawiązaniu do powyższego i w odniesieniu do atenuowanego szczepu szczepionkowego, uzyskanego w wyniku delekcji genów kodujących chorobotwórczość, rewersja takiego szczepu do zjadliwości jest mało prawdopodobna ze względu na dużą stabilność zmodyfikowanego genetycznie DNA. Nie jest jednak wykluczone i wymaga sprawdzenia, czy zaszczepione zwierzęta mogą zakazić się terenowym szczepem ASF, którego geny kodujące zjadliwość mogą zostać włączone do genomu szczepu szczepionkowego, który uzjadliwi się i wywoła zachorowanie szczepionych świń.

W celu uniknięcia związanych ze stosowaniem szczepionek z atenuowanymi szczepami ewentualnych powikłań poszczepiennych należy przy konstruowaniu szczepu szczepionkowego dążyć do równowagi między jego zjadliwością, związaną ze stopniem atenuacji, a skutecznością przeciwważną, dla osiągnięcia której resztkowa zjadliwość szczepu szczepionkowego niejednokrotnie jest pożądana. Jednak zbyt daleko idąca atenuacja szczepu szczepionkowego prowadzi do uzyskania szczepionki o niskiej skuteczności, czego efektem może być pojawienie się u immunizowanych świń po zetknięciu się z terenowym wirusem zjadliwym bezobjawowe nosicielstwo i siewstwo ASFV. Natomiast atenuacja niskiego stopnia szczepu szczepionkowego może być powodem powikłań poszczepiennych. Doskonalenia wymaga zatem metodyka umożliwiająca uzyskanie optymalnego wyniku co do wartości ochronnej i nieszkodliwości biopreparatu, co dotychczas nie zostało w oczekiwanim stopniu osiągnięte.

Delekcja (usunięcie) genów warunkujących zjadliwość z genomu szczepu kandydata na szczep szczepionkowy ciągle jeszcze skutkuje równoczesnym osłabieniem jego immunogenności, prawdopodobnie ze względu na wzajemne powiązania w genomie. W związku z tym, uzyskując szczepionkę niewywołującą powikłań poszczepiennych, równocześnie uzyskujemy biopreparat o niskiej skuteczności (9, 10). Z tego powodu w poszukiwaniu szczepu szczepionkowego należy w obrębie genotypu lub kilku genotypów badać możliwie liczne szczepy ASFV o znaczeniu epidemiologicznym w celu trafienia na optymalne połączenie maksymalnego kodowania antygenów immunogennych i delekcji genów warunkujących patogenność szczepu szczepionkowego. Innymi słowy, konieczne są dalsze badania w kierunku optymalizacji kombinacji genów, które mogą podlegać delekcji przy zachowaniu cech szczepu szczepionkowego, niezbędnych do produkcji szczepionki, która ma szansę na urzędową rejestrację jako preparat komercyjny.

Prowadzone są aktualnie prace nad uzyskaniem genomu ASFV zdolnego do pobudzania w organizmie zwierzęcia produkcji znacznych ilości interferonu (IFN). Ważnym tematem, wymagającym dalszych badań w celu doskonalenia skuteczności szczepionek, są prace dotyczące uzyskania lepszych linii komórkowych, przydatnych do namnażania szczepów szczepionkowych ASFV.

Obecnie w Państwowym Instytucie Weterynaryjnym – PIB w Puławach w ramach projektów finansowanych przez Narodowe Centrum Nauki oraz przez europejski program Horyzont 2020 prowadzone są pilotażowe badania nad możliwością opracowania prototypu atenuowanego szczepu ASFV należącego do genotypu II. Do modyfikacji genomu ASFV w obrębie genów wirusa mających potencjalny wpływ na unikanie przez niego odpowiedzi immunologicznej zakażonego gospodarza stosowany jest system inżynierii genetycznej CRISPR/Cas9. Zastosowanie tego typu nowoczesnych narzędzi inżynierii genetycznej, a następnie badanie opracowanych prototypów wirusa w warunkach *in vivo* z użyciem świń pozwalają przede wszystkim na udzielenie odpowiedzi na pytanie dotyczące funkcji poszczególnych regionów genomu ASFV i wpływie wprowadzonych modyfikacji na patogenność wirusa dla świń.

Trudno jest jednak jednoznacznie mówić o efektywnym systemie czy ostatecznym projekcie opracowania szczepionki przeciwko ASF.

Podsumowując dane z cytowanej na wstępie publikacji (1), niedostatecznie scharakteryzowane są mechanizmy związane z ochroną immunologiczną przeciwko ASFV u świń i dzików. Wykazano, że dla przeciwdziałania zakażeniu i chorobie niezbędne jest wywołanie odporności swoistej humoralnej i komórkowej, tak aby nie uzyskiwać tylko częściowej odporności, która u immunizowanych świń wywala siewstwo wirusa ASF i utrzymywanie się epidemii na danym obszarze.

Badania nad uzyskaniem szczepionek przeciw ASF ważne są przede wszystkim w aspekcie opracowania technologii produkcji szczepionki przeciw ASF dla dzików do jej doustnej aplikacji za pośrednictwem atrakcyjnych dla nich kęsów. Doświadczenia związane ze zwalczaniem klasycznego pomoru świń w Niemczech dowodzą, że dysponowanie taką szczepionką jest niezwykle ważnym elementem w programie zwalczania ASF.

Należy pamiętać, że podstawą urzędowej zgody użycia szczepionki przeciw ASF w warunkach terenowych jest dysponowanie wiarygodnym testem diagnostycznym DIVA, umożliwiającym odróżnianie zwierząt szczepionych od zwierząt zakażonych patogenym wirusem ASF. W celu zapewnienia właściwego odczytu szczepionka powinna zawierać odpowiednie markery, umożliwiające takie różnicowanie.

Podobne dane jak scharakteryzowane powyżej, z ośrodków europejskich, pochodzą z też z Uniwersytetu Illinois w Urbannie w USA (11). Z danych tych wynika, że ochronna, przeciwważna odporność przeciw ASFV nie jest do dzisiaj poznana w stopniu wystarczającym, tak w przypadku odporności humoralnej, jak też komórkowej. Bierny transfer przeciwciał swoistych dla ASFV wystarcza do ochrony zakażanego zwierzęcia przed zachorowaniem i zejściem śmiertelnym (12). Jednak białka wirusa, czyli antygeny, które pobudzają wytwarzanie swoistych przeciwciał, nie zostały dotychczas zidentyfikowane w dostatecznym stopniu. Opisano neutralizujące wirus przeciwciała (13), ale nie ma pewności, czy rzeczywiście odgrywają one rolę w odporności przeciwważnej. Liczne wyniki wspierają pogląd o roli odporności komórkowej przeciw ASF (14, 15). Nie do końca zostały zidentyfikowane geny odpowiedzialne za wytwarzanie w ASFV antygenów uodporniających przeciw ASFV

i geny warunkujące zjadliwość (16). Delecja tych drugich umożliwiła uzyskanie szczepów ASFV niewywołujących powikłań poszczepiennych, chociaż zbyt daleko idąc w kierunku nieszkodliwości szczepionki, można uzyskać preparaty o niskich właściwościach uodporniających.

Konkludując, badania w wielu ośrodkach badawczych wskazują, że niezmiernie trudno jest uzyskać szczepionki niewywołujące powikłań poszczepiennych, a równocześnie cechujące się wysokim stopniem wartości uodporniającej dla świń i dzikich przeciwko ASF.

Nie dysponujemy zatem do dzisiaj szczepionkami, które mogłyby być stosowane do zwalczania ASF występującego obecnie w Europie, jak też w Azji. To samo dotyczy kontynentu afrykańskiego, gdzie ASF występuje w wielu gatunków świń nieudomowionych.

Trudno określić, kiedy zostanie opracowana dla świń i dzików skuteczna i nieszkodliwa szczepionka przeciw ASF, jednak eksperci w tej dziedzinie uważają, że może to zająć jeszcze wiele kolejnych lat.

Piśmiennictwo

1. European Commission, Directorate General for Health and Food Safety: *Working Document on the possible development of a vaccine for African Swine Fever prepared by the African Swine Fever EU reference laboratory*, Brussels, 31 January 2017, 1–36.
2. Takamatsu H.H.: Cellular immunity in ASFV responses. *Virus Res.* 2013, **173**, 110–121.
3. Burmakina G.: African swine fever virus serotype – specific proteins are significant protective antigens for African swine fever. *J. Gen. Virol.* 2016, **97**, 1670–1675.
4. Martins C.L.V.: African swine fever virus specific porcine cytotoxic T cell activity. *Arch. Virol.* 1993, **129**, 211–225.
5. Oura C.A.: In vivo depletion of CD8+T lymphocytes abrogates protective immunity in African swine fever virus. *J. Gen. Virol.* 2005, **86**, 2445–2450.
6. Blome S.: Modern adjuvants do not enhance the efficacy of an inactivated African swine fever virus vaccine preparation. *Vaccine* 2014, **32**, 3879–3882.
7. Neilan I.G.: Neutralizing antibodies to African swine fever virus proteins p30, p54 and p72 are not sufficient for antibody – mediated protection. *Virology* 2004, **319**, 337–342.
8. Lacasta A.: Expression library immunization can confer protection against lethal challenge with African swine fever virus. *J. Virol.* 2014, **88**, 13322–13332.
9. Alonso L.: African swine fever virus, NL gene is not required for virus virulence. *J. Gen. Virol.* 1998, **79**, 2543–2547.
10. Sanford B.: Deletion of the thymine kinase gene induces complete attenuation of the Georgia isolate of African swine fever virus. *Virus Res.* 2016, **213**, 165–171.
11. Rock D.L.: Challenges for African swine fever vaccine development – perhaps the end of the beginning. *Vet. Microbiol.* 2017, **206**, 52–58.
12. Schlafer D.H., Mebus C.A., McVica J.W.: African swine fever in neonatal pigs. *Am. J. Vet. Res.* 1984, **45**, 1367–1372.
13. Gomez-Puertas P., Rodriguez F., Owidelo J.M., Ramiro-Ibanez F., Ruis-Conzalvo F., Alonzo C., Escribano J.M.: Neutralizing antibodies to different proteins of African swine fever virus inhibit both virus attachment and internalization. *J. Virol.* 1996, **70**, 5689–5694.
14. King K., Chapman D., Argilagnat J.M., Fishbourne E., Hutet E., Cariolet R., Dixon L.K., Takamatsu H.H.: Protection of European domestic pigs from virulent African isolates of African swine fever virus by experimental immunization. *Vaccine* 2011, **29**, 4593–4600.
15. Lacasta A., Monteaguolo P.L., Jimenez-Marin A.: Live attenuated African swine fever viruses as ideal tools to dissect the mechanisms involved in viral pathogenesis and immune protection. *Vet. Res.* 2015, **46**, 135–140.
16. Corria S., Ventura S., Parkhouse R.M.: Identification and utility of innate immune system evasion mechanism of ASFV. *Virus Res.* 2013, **173**, 87–100.

Prof. dr hab. Zygmunt Pejsak, Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy, al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy, e-mail: zpejsak@piwet.pulawy.pl