

# Szczepionka przeciwko afrykańskiemu pomorowi świń

Zygmunt Pejsak<sup>1</sup>, Marian Truszczyński

z Uniwersyteckiego Centrum Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Jagiellońskiego – Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie<sup>1</sup>

Według najnowszych danych, cytowanych przez niekwestionowanego lidera i światowy autoritet w zakresie badań nad afrykańskim pomorem świń, prof. José Manuela Sánchez-Vizcaíno z Universidad Complutense w Madrycie, mimo istotnego postępu w doskonaleniu skuteczności i nieszkodliwości szczepionki przeciwko ASF, jak dotychczas żadna z nich nie została zaakceptowana przez Komitet ds. Weterynaryjnych Produktów Leczniczych Europejskiej Agencji Leków i Amerykańskiej Agencji Żywności i Leków. Innymi słowy, nikt dotychczas takiej szczepionki nie opracował, o czym świadczą również inne publikacje dotyczące tego zagadnienia (1).

Jednocześnie wiadomo, że świnię po przebytych zakażeniu i wyzdrowieniu uzyskują odporność przeciwko powtórnej infekcji wysoce zjadliwym szczepem wirusa ASF (ASFV). Dotyczy to jednak, z nielicznymi wyjątkami, szczepów homologicznych w stosunku do szczepu, który wywołał zakażenie i wzbudził odporność (2). W środowisku występują jednak także szczepy heterologiczne ASFV, przeciwko którym szczepionka o innej swoistości chroniłaby tylko w ograniczonym stopniu.

Dotychczas nie wyjaśniono, w jaki sposób powstają układy heterologiczne, czyli różny poziom swoistości immunologicznej między szczepem uodporniającym

i zjadliwym szczepem sprawdzającym efektywność uodpornienia (2, 3). Ciągłe zatem mechanizmy odporności przeciwko zakażeniu ASFV nie są wystarczająco dobrze poznane. Dodać należy, że w ochronie przeciwzakażnej dla omawianej choroby, bierze udział odporność komórkowa, głównie komórki jednójądźrzaste, jak również odporność humoralna reprezentowana przez swoiste przeciwciała neutralizujące. Istotną rolę odgrywa również dopełniacz – czynnik odporności wrodzonej (4). Główną przyczyną niedostatecznej poszczepiennej odporności ochronnej przeciwko ASF nie musi być jakość szczepionki, ale duża różnorodność antygenowa izolatów ASFV. Badania *in vivo* i *in vitro* wskazują na udział ASFV w komórkowej lizie i cytotoksyczności zależnej od komórek T CD8 oraz NK (5).

Zwalczanie ASF prowadzące do ograniczenia występowania, a następnie eradykacji choroby i rezerwuarów wirusa ma charakter kompleksowy. Skuteczna, nieszkodliwa szczepionka może odegrać więc znaczącą rolę. Postępowanie stopniowo eliminujące ASF opiera się jednak przede wszystkim na realizowaniu wytycznych aktów prawnych Światowej Organizacji Zdrowia Zwierząt (OIE) i krajowych służb weterynaryjnych, reprezentowanych przez Głównych Lekarzy Weterynarii poszczególnych państw. Celem niniejszej publikacji jest przedstawienie stanu wiedzy

na temat uzyskania szczepionki przeciwko ASF, niezbędnej w zwalczaniu i eradykacji tej choroby.

Po raz pierwszy, na przełomie lat 50. i 60. ubiegłego wieku w Portugalii i Hiszpanii, w zwalczaniu ASF u świń zastosowano w warunkach doświadczalnych szczepionki, które zawierały żywy, atenuowany naturalnie ASFV. Cechowały się one szczątkową zjadliwością i wywoływały u niektórych uodpornianych świń przejściową reakcję poszczepienną w postaci podwyższonej temperatury ciała, osowiałości oraz obniżenia łaknienia w ciągu 1–3 dni. Objawy te byłyby do zaakceptowania, gdyby równolegle nie rozwijała się u zwierząt kliniczna postać ASF i siewstwo wirusa. Okazało się bowiem, że szczep ten podany świniom w warunkach terenowych wywoływał u znacznego odsetka immunizowanych zwierząt objawy kliniczne i siewstwo wirusa szczepionkowego, co prowadziło do rozwoju ASF u świń wrażliwych na zakażenie. W konsekwencji strat, związanych z immunizacją zwierząt szczepionkami atenuowanymi zostały one wówczas wycofane ze stosowania.

W podjętych później w wielu krajach, w tym w USA, badaniach nad uzyskaniem szczepionki przeciwko ASF wykazano, że zupełnie nieskuteczne były szczepionki inaktywowane. Z kolei szczepionki podjednostkowe, które okazały się całkowicie nieszkodliwe, były tylko częściowo skuteczne, więc również nie znalazły zastosowania w programach zwalczania ASF (5).

Powrócono więc do prac nad otrzymaniem szczepionki atenuowanej. Wykazano bowiem, że występujące naturalnie lub uzyskane w warunkach laboratoryjnych szczepy ASFV o niskiej zjadliwości/patogenności dają największe szanse opracowania szczepionek skutecznych i nieszkodliwych. Brakuje jednakże jednoznacznej podstawy do stwierdzenia, że szczepy takie po zastosowaniu u świń nie będą ulegały rewersji w kierunku zwiększenia ich chorobotwórczości (5, 6, 7, 8).

W Europie, Rosji i Chinach afrykański pomór świń jest najczęściej spowodowany zakażeniem szczepami wysoce zjadliwymi, należącymi do genotypu II wirusa. ASFV jest dużym, dwuniciowym wirusem DNA. Jego genom ma wielkość około 17–19 tys. par zasad i koduje ponad 150 białek, wśród których około 70 stanowią białka strukturalne. Dużą część genomu ASFV stanowią tzw. rodziny wielogenowe MGF (multigene families) takie jak MGF360, MGF110, MGF300 czy MGF530. Stwarzająca olbrzymie problemy przy opracowaniu szczepionki różnorodność genetyczna izolatów ASFV polega zazwyczaj na braku lub obecności dodatkowych kopii genów MGF. Przykładowo grupa genów MGF360 zawiera 11–15 genów, a rodzina MGF530 to 9–10 genów. Funkcja tych dwóch rodzin wielogenowych jest prawdopodobnie związana z proliferacją zakażonych makrofagów oraz hamowaniem ekspresji interferonu typu I (12). Oczywiście jest, że przy tak dużej liczbie genów identyfikacja tych, które mogą wyzwać ekspresję białek ochronnych po podaniu szczepionki jest bardzo trudna. Co więcej, testowanie szczepów-kandydatów do uzyskania ewentualnej szczepionki może być prowadzona wyłącznie na świniami lub dzikach, a nie np. na myszach lub innych zwierzętach

### Vaccine against African swine fever

Pejsak Z.<sup>1</sup>, Truszczyński M., University Centre of Veterinary Medicine JU-AU in Krakow<sup>1</sup>

African swine fever (ASF), occurring for many years, is at present the most significant viral disease of swine and wild boar. Despite of the situation, defined as a large epidemic or even pandemic, a vaccine is not yet available. It has been claimed that live, attenuated anti-ASF vaccines are most promising products on the way to control the disease. However the safe and effective vaccine is yet to be obtained. The current status in the field of ASFV vaccine development is encouraging, since ASFV strain(s) have been obtained, that have their virulence genes deleted. Deletion of ASFV genes that inhibit host antiviral type I interferon responses is considered as the most effective strategy to attenuate the virus. Deleted, live vaccinal strain(s) are still able to replicate and encode immunogenic antigens thus induce protective immunity in swine. However, a licensed cell line in which live, attenuated virus (LAV) can be propagated and produced on a large scale, is still not available. Concerning wild boar, the natural reservoir of ASFV, while developing live vaccine for swine protection, rigorous conditions for its safety and efficacy are strongly required.

**Keywords:** African swine fever, live vaccines, swine, wild boar, safety.

laboratoryjnych, ze względu na fakt, że nie posiadają one swoistych dla białek ASFV receptorów i nie są dla tych gatunków patogenne.

Zabite szczepionki przeciwko ASF są nieskuteczne. Znacznie lepsze efekty uzyskuje się, stosując szczepionki atenuowane, sporządzone z naturalnie występujących szczepów wirusa o niskiej zjadliwości lub ze szczepów żywych, zmodyfikowanych. Powstała u świń odporność ochronna zabezpiecza jednak tylko przed zakażeniem homologicznym szczepem, należącym to tego samego genotypu, ale nie przed zakażeniem szczepem heterologicznym wirusa. Przy stosowaniu szczepionek atenuowanych mogą występować skutki niepożądane, jak zmiany skórne i obrzęk stawów, co w zasadzie uniemożliwia ich wprowadzenie do użytku. Wśród działań niekorzystnych, związanych z resztkową zjadliwością, jest też niebezpieczeństwo wystąpienia przewlekłego zakażenia szczepem szczepionkowym i zagrożenie jego rewersją do szczepu zjadliwego. Także produkcja takich szczepionek napotyka zasadnicze problemy, ponieważ ASFV namnaża się w hodowli pierwotnej makrofagów świń i nie ma ustalonej linii komórkowej będącej jej odpowiednikiem. Z tych powodów intensywnie bada się także możliwość uzyskania bezpiecznej i skutecznej szczepionki z podjednostek oraz szczepionki wektorowej przeciwko ASF.

Ponadto ustalono, że świnie uodporniane szczepem atenuowanym ASFV nie uzyskują pełnej odporności krzyżowej na niespokrewnione szczepy terenowe. Wobec braku jednoznacznych danych odnośnie do różnic w nabywaniu odporności poszczepiennej przez poszczególne osobniki stosowanie żywej szczepionki może być więc również nieskuteczne.

W badaniach szczepów-kandydatów do uzyskania żywej szczepionki przeciwko ASF określono geny, kodujące czynniki zjadliwości wirusa. Podjęto więc prace mające na celu uzyskanie bezpiecznych, niezjadliwych

szczepów poprzez delecję tych genów. Okazało się, że skutki delecji tego samego genu były różne w zależności od szczepu wirusa ASF, a więc efekt atenuacji molekularnej był zróżnicowany (8, 9, 10). Dwa szczepy ASFV – Malawi i Georgia – poddano skutecznej atenuacji poprzez delecję genów warunkujących zjadliwość, ale tylko szczep Malawi zachował zdolność wzbudzania odporności u świń.

Poważną trudnością w uzyskaniu bezpiecznej i skutecznej szczepionki przeciwko ASF jest też opisywana u szczepów szczepionkowych zmienność, która nie dość, że obniża poważnie skuteczność takiej szczepionki, ale też znacząco zwiększa podatność niektórych, uodpornianych świń na ryzyko zakażenia szczepami terenowymi wirusa. Przebieg zakażenia jest u tych zwierząt gwałtowny i częste są u nich upadki w przebiegu ASF.

W podsumowaniu swoich wieloletnich badań Rock i wsp. (5) stwierdzili, że na obecnym etapie prac, pomimo niewątpliwego postępu, opracowywana przez nich szczepionka nie może być testowana w warunkach terenowych.

Kolejną przeszkodą na drodze do eliminacji afrykańskiego pomoru świń poprzez szczepienia ochronne jest brak systemu DIVA (differentiating infected from vaccinated animals), który w badaniu serologicznym umożliwia odróżnienie świń zakażonych naturalnie od szczepionych. Jak się wydaje, szczepionki delecyjne mogą być dobrym kandydatem do opracowania tego systemu. Nie ma jednak, jak dotąd, prac potwierdzających takie przypuszczenie i rozwiązanie tego zagadnienia jest najpewniej odległe w czasie.

Pogląd ten potwierdzają autorzy najnowszego opracowania na temat szczepionki przeciwko ASF – badacze z ośrodków naukowych w Uppsali (Szwecja) i Pirbright (Wielka Brytania; 11). Wskazują oni, że atenuowane szczepionki przeciw ASF u świń i dzików są najbardziej obiecującą technologią, a ponadto ostatnio poczyniono znaczne postępy w konstruowaniu żywych szczepionek delecyjnych.

Poważnym ograniczeniem w pracach nad uzyskaniem nieszkodliwej i skutecznej szczepionki przeciwko ASF jest brak modelu zwierzęcego innego niż naturalny gospodarz. ASFV może zakażać jedynie świnię i dziki. Wszystkie dotychczasowe prace prowadzone były na świniami i dotyczyły szczepionek, które mogą być podawane w iniekcji. Szczepionki przeznaczone dla dzików powinny natomiast przejść badania na tym gatunku. Należy pamiętać, że w warunkach naturalnych muszą być podawane doustnie w postaci kęsów. Bardzo ważny jest więc sposób wprowadzania szczepionki do środowiska leśnego; powinna być zakopywana na odpowiednią głębokość, a kęsy muszą być na tyle atrakcyjne smakowo, aby dziki niezależnie od wieku były nimi zainteresowane.

Według Rocka i wsp. (5) teoretycznie powinno być możliwe uzyskanie szczepów ASFV o dużo większej nieszkodliwości i immunogenności niż będące obecnie w dyspozycji żywe, atenuowane szczepy szczepionkowe. Staje się to możliwe między innymi dlatego, że przeprowadzone w wielu laboratoriach porównawcze badania genomu różnych szczepów ASFV pozwoliły na

identyfikację części genów kodujących ich zjadliwość i patogenność oraz immunogenność. Dysponujemy już szczepami ASFV z dokonaną, w warunkach laboratoryjnych, delecją genów, między innymi determinujących ekspresję kinazy tymidynowej (TK) oraz odpowiedzialnych za ekspresję białek 9GL (B11GL) i NL (DP71L), które decydują o zjadliwości wirusa. Co ważne, usunięcie tych genów nie pozbawiło tak zmodyfikowanego ASFV zdolności do indukcji odporności ochronnej przeciw homologicznemu szczepowi wirusa (13). Uzyskana atenuacja ASFV jest w tym przypadku związana najprawdopodobniej z osłabieniem namnażania się tych szczepów wirusa w makrofagach, które są głównym celem jego intensywnego replikacji. Co ciekawe, delecja genu determinującego ekspresję białka NL w europejskim szczepie E70 zmniejszyła zjadliwość i ograniczyła replikację tego szczepu u świń, nie hamując jego namnażania się w makrofagach, w warunkach *in vitro*. Jest to niezwykle ważne z punktu widzenia możliwości namnażania ASFV w komórkach hodowanych *in vitro* dla potrzeb produkcji przyszłej szczepionki.

Wykazano również, że skutki delecji genów warunkujących zjadliwość oraz immunogenność mogą się różnić, zależnie od szczepu poddanego temu procesowi. Dowiedziono bowiem, że delecja genu decydującego o ekspresji białka NL w europejskim szczepie E-70 całkowicie pozbawiła ten szczep zjadliwości, natomiast nie uzyskano tego efektu u dwóch innych atenuowanych w ten sam sposób szczepów ASFV, izolowanych od świń afrykańskich. Stwierdzono też, że usunięcie wielu genów z genomu ASFV może negatywnie wpływać na immunogenność tych szczepów.

Inne podejście do modyfikacji genomu ASFV – w kierunku osłabienia jego patogenności – polega na delecji genów, które kodują białka wirusowe, biorące udział we wzbudzeniu syntezy interferonu przez makrofagi. Geny, które zostały poddane delecji, należą do rodzin wielogenowych MGF360 i MGF505. Szczep ASFV, osłabiony w ten sposób, zachowywał zdolność wzbudzania silnej, poszczepiennej odporności ochronnej.

Należy podkreślić, że modyfikacje genetyczne oddziałują nie tylko na poprawę bezpieczeństwa i zwiększenie immunogenności szczepu, ale także umożliwiają wprowadzenie do genomu wirusa markerów, pozwalających na odróżnianie osobników szczepionych od zakażonych (DIVA). Jest to bezwzględnie konieczne do monitorowania skuteczności szczepień i potwierdzenia eliminacji ASFV. Na razie uzyskano obiecujące wyniki we wstępnych badaniach, wykonanych w warunkach laboratoryjnych. Jest oczywiste, że następny etap wymaga sprawdzenia przydatności szczepów-kandydatów w próbie biologicznej u naturalnego gospodarza ASFV.

Dużym utrudnieniem jest brak ustalonej, licencjonowanej linii komórkowej makrofagów świń, która jest konieczna jako podłoże do namnażania szczepów szczepionkowych wirusa.

Warto przypomnieć, że żywe, atenuowane szczepionki były i nadal są już wykorzystywane z powodzeniem w programach eradykacji takich chorób zakaźnych, jak kściegus czy choroba Aujeszkyego. Istnieją jednak obawy co do ich pełnej nieszkodliwości, która

powinna przejawiać się w całkowitym braku wszelkich działań niepożądanych oraz siewstwa wirusa szczepionkowego. Szczepionka atenuowana niekoniecznie musi chronić wszystkie immunizowane zwierzęta, ale odsetek skutecznie uodpornionych zwierząt powinien być jak najwyższy. Tylko wtedy szerzenie się choroby zakaźnej może zostać powstrzymane.

W odniesieniu do ASF, w warunkach terenowych, zwierzęta są często zakażone krążącym w środowisku szczepem wirusa i zaszczepienie ich – co *de facto* nie powinno mieć miejsca – nie będzie zapobiegać długotrwałemu niekiedy siewstwu szczepu terenowego, a to znacząco spowalnia jego eliminację i zwalczanie choroby. Obserwacje te poczyniono podczas badań nad szczepionką, do otrzymania której użyto naturalnie osłabionego, a więc słabo zjadliwego szczepu ASFV, wyizolowanego od dzików na Łotwie w 2017 r. (14).

Wirus ten, który początkowo dawał duże nadzieje na jego wykorzystanie do uzyskania szczepionki przeciwko ASF, wywołał w części świń objawy kliniczne podobne do występujących w przewlekłej postaci choroby. Co więcej, naturalnie osłabiony szczep łotewski, który posłużył do otrzymania prototypowej serii szczepionki, intensywnie replikował się w organizmie immunizowanych zwierząt, u których osiągał wysokie miana we krwi. Uodporniane świny wydalały okresowo wirus szczepionkowy i zakażały tą drogą zwierzęta, które wraz z nimi przebywały w kojcu.

Wobec pandemii ASF nie dziwi pragnienie jak najszybszego uzyskania szczepionki, która będzie zapobiegać tej chorobie u świń i dzików. Może to niestety sprzyjać dopuszczeniu do stosowania szczepionek, których nieszkodliwość nie jest stabilna. Takie postępowanie grozi utrwaleniem się stanu nosicielstwa u zwierząt i ogromnymi stratami w hodowli i gospodarce, jak to miało miejsce kilkadziesiąt lat temu w Portugalii i Hiszpanii. W jedenastym wydaniu klasycznego podręcznika *Diseases of Swine* z 2019 r. (1) specjaliści światowej rangi piszą, że pomimo istotnego postępu w pracach nad uzyskaniem nieszkodliwej i wysoce skutecznej szczepionki przeciwko ASF nie udało się otrzymać takiego preparatu, który spełniałby warunki niezbędne do jego zarejestrowania i wprowadzenia na rynek.

Jak wspomniano na wstępie, główną przyczyną indywidualnych różnic w odporności poszczepiennej u świń immunizowanych przeciwko ASF są uwarunkowane genetycznie odmienności w rozwoju humoralnej odpowiedzi immunologicznej, przejawiające się bardzo niskimi mianami przeciwciał neutralizujących wirus.

Pewną nadzieję na pokonanie tego ograniczenia dają wyniki najnowszych prac badaczy amerykańskich (15). Autorzy wykorzystali w nich delecyjny szczep wirusa ASF, pozbawiony genu I177L. Podanie świniom tak zmodyfikowanego szczepu indukowało u nich 100% ochronę przed doświadczalnym zakażeniem terenowym wirusem zjadliwym, co bywa określane jako odporność sterylna (sterile immunity). Oznacza to, że delecja genu I177L przyczyniła się do powstania u zaszczepionych świń przeciwciał, w pełni zapobiegające zakażeniu szczepem zjadliwym.

Ważną przyczyną trudności, względnie niemożności uzyskania odpowiedniej szczepionki, jest duża różnorodność antygenowa terenowych izolatów ASFV. W podsumowaniu trzeba zdecydowanie stwierdzić, że wobec braku licencjonowanej szczepionki przeciw ASF, do momentu jej pojawienia się, co według jednych nastąpi niebawem, a według innych (większości) za kilka lat, należy korzystać z wytycznych bioasekuracji i solidnej diagnostyki, uwzględniającej postęp biotechnologiczny, jaki dokonał się w ostatnich latach.

## Piśmiennictwo

1. Sanchez-Vizcaino J.M., Laddomada A., Arias M.L.: African Swine Fever Virus. W: Zimmerman. J.J, Karriker L.A., Ramirez A.; Schwartz K. J., Stevenson G. W., Zhang J. (edit.): *Diseases of Swine*, Wiley Blackwell, NJ, USA, 2019.
2. Burmakina G., Magolovkin A., Tulman E.R.: African Swine Fever Virus serotype specific proteins are significant protective against African swine fever. *J. Gen. Virol.* 2016, **97**, 1670–1675.
3. King K., Chapman D., Argullauget J.M.: Protection of European domestic pigs from virulent African isolates of ASFV by experimental immunization. *Vaccine* 2011, **29**, 4593–4600.
4. Takamatsu H.H., Denyer M.S., Lacasta A.: Cellular immunity in ASFV responses. *Virus Res.* 2013, **102**, 110–121.
5. Rock D.L. Challenges for African swine fever vaccine development – “...perhaps the end of the beginning”. *Vet. Microbiol.* 2017, **206**, 52–58.
6. Mebus C.A., Mv-Vicar J.W., Dardiri A.H.: Comparison of the pathology of high and low virulence African swine fever infections. W: *African Swine Fever*. CEC/FAO, Sardinia, 1981.
7. Dardiri A.H., Mebus C.A.: Western hemisphere isolates of ASFV asymptomatic carriers and resistance to challenge infection. *Am. J. Vet. Res.* 1980, **41**, 1867–1869.
8. Lacasta A., Herera-Urbe J., Jimenez Marin A.: Comparative proteomic analysis reveals different responses in porcine lymph nodes to virulent and attenuated homologous African swine fever virus strains. *Vet. Res.* 2018, **12**, 49–60.
9. Tulman E.R., Delhon G.A., Ku B.K., Rock D.C.: African swine fever virus. *Curr. Top Microbiol. Immunol.* 2009, **328**, 43–87.
10. Corria S., Ventura B., Parkhouse R.M.: Identification and utility of innate immune system evasion mechanism of ASFV. *Virus Res.* 2013, **173**, 87–100.
11. Dixon L.K., Stahl K., Jori F., Vial L., Pfeiffer D.V.: African Swine Fever Epidemiology and Control. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 2020, **15**, 221–246.
12. Karalyan Z.A., Izmailyan R.A., Abrayan L.O., Avitson J.: Evaluation of Viral Genome Copies Within Viral Factories on Different DNA Viruses. *J. Histochem Cytochem.* 2018, **66**, 359–365.
13. Zsak I., Lu Z., Kutish G.F., Neilan J.G., Rock D.L.: An African swine fever virus virulence associated gene NL-S with similarity to the herpes simplex virus ICP 34.5 gene. *J. Virol.* 1996, **70**, 8865–8871.
14. Gallardo C., Soler A., Rodze I., Nieto R., Cano-Gomez C., Fernandez-Pineiro J., Arias M.: Attenuated and non-gaemadsoebing (nom-HAD) genotype II African swine fever (ASFV) isolated in Europe, Latvia 2017. *Transbound. Emerg. Dis.* 2019, **66**, 1399–1404.
15. Zhu J.J., Ramanathan P., Bishop E., O’Donnell V., Glaude D.P., Borca M.V.: Mechanism of African swine fever virus pathogenesis and immune evasion inferred from gene expression changes in infected swine macrophages. *PLoS One.* 2019, **14**, 44 (11). doi 10.1371.