

Szczepionka przeciwko afrykańskiemu pomorowi świń – gdzie jesteśmy i dokąd zmierzamy

Małgorzata Pomorska-Mól, Hanna Turlewicz-Podbielska, Agata Augustyniak, Izabela Kucińska

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

Afrykański pomór świń, wywoływany przez wirusa afrykańskiego pomoru świń (ASFV), to groźna, śmiertelna choroba występująca u świń domowych i dzikich (1, 2). Choroba ma istotny negatywny wpływ na światowy przemysł trzody chlewnej. Obecnie na terenie Europy, Azji i Oceanii oraz Ameryki Południowej krąży genotyp II ASFV (z wyjątkiem genotypu I, który jest endemiczny na Sardynii; **ryc. 1**; 1, 2, 3). Aktualnie nie ma zarejestrowanej szczepionki przeciwko ASF. Kontrola choroby opiera się na zapewnieniu

bezpieczeństwa biologicznego, wczesnej diagnostyce i wybijaniu zwierząt (stad) zakażonych ASFV (1, 2). Procedury diagnostyczne w odniesieniu do rozpoznawania ASF są regulowane i pozostają pod ścisłymi zaleceniami Światowej Organizacji Zdrowia Zwierząt (OIE), jak również Europejskiego Laboratorium Referencyjnego ds. ASF (4, 5). Podczas gdy wczesne wykrycie i usunięcie zakażonych zwierząt wydaje się niezbędne do wyeliminowania lub zmniejszenia ryzyka przeniesienia wirusa, prewencyjny ubój lub

depopulacja w gospodarstwie często prowadzi do wysoce emocjonalnych sytuacji, a właściciele zwierząt nie widzą uzasadnienia dla tak drastycznych środków. Przestrzeganie zasad bezpieczeństwa biologicznego na poziomie gospodarstwa i krajowych rozporządzeń dotyczących zwalczania chorób jest niezbędne w zwalczaniu choroby i zapobieganiu rozprzestrzenianiu się wirusa. Jak pokazuje życie, strategie te są jednak niewystarczające do zwalczania choroby i często niemożliwe do wdrożenia w krajach o ograniczonych zasobach, głównie w Afryce czy Azji, ale także w krajach wysoko rozwiniętych. Zwalczanie ASFV, zarówno w Europie czy Azji, jak i w Afryce, jest niezwykle trudne ze względu na łatwość rozprzestrzeniania się tego patogenu, wysoką oporność ASFV na warunki środowiskowe oraz wiele przeszkód związanych z opracowaniem skutecznej immunoprophylaktyki swoistej. W ostatnich latach coraz większa liczba zespołów badawczych na całym świecie pracuje nad opracowaniem skutecznej szczepionki (6, 7, 8, 9, 10, 11, 12). Najnowsze wyniki badań wskazują, że jej pojawienie się wydaje się coraz bardziej realne, choć jest zgoda co do tego, że na rynku komercyjna szczepionka w najbliższych latach raczej się nie pojawi.

Szczepionka przeciwko ASF – co już wiemy

Do chwili obecnej nie opracowano bezpiecznej i skutecznej szczepionki przeciwko ASF. Dotychczas przebadane prototypy szczepionek inaktywowanych przeciwko ASFV nie zapewniły skutecznej odpowiedzi przeciwzakaźnej. Preparaty nie były skuteczne w indukowaniu specyficznych cytotoksycznych limfocytów T CD8+, kluczowych dla eliminacji komórek zakażonych wirusem. Wykazano jednak, że zwierzęta, które przeżyły ostre zakażenie umiarkowane zjadliwym ASFV, wykazywały długotrwałą ochronę przed zakażeniem homologicznymi szczepami ASFV. Ponadto, podanie siary lub przeciwciał pochodzących od świń rekonwalescentów z ASF zapewniało częściową ochronę przed eksperymentalnym zakażeniem zjadliwymi szczepami ASFV. Fakty te wskazują,

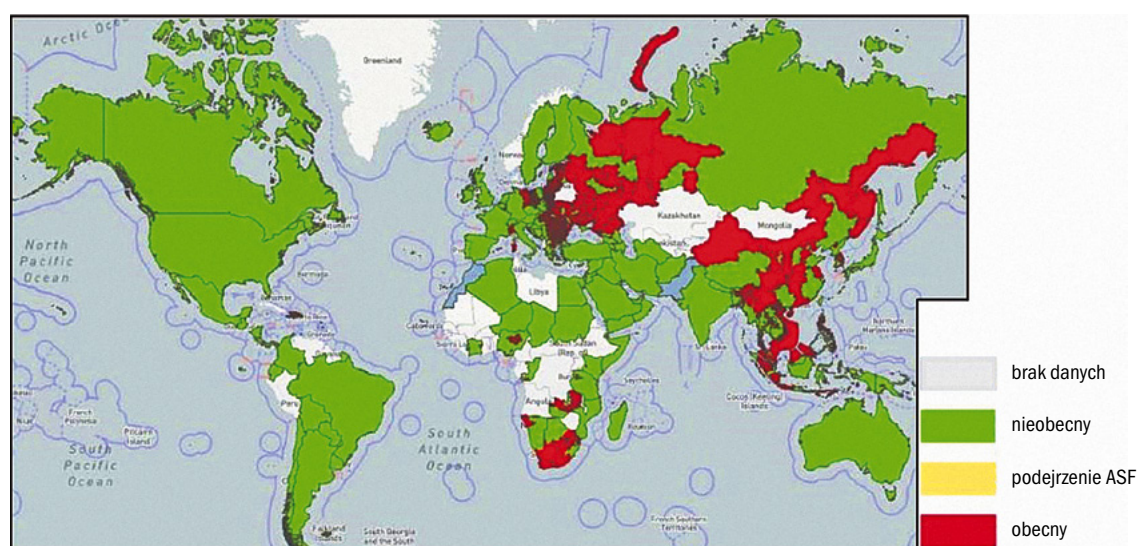
Vaccine against African swine fever – where are we and where are we going?

Pomorska-Mól M., Turlewicz-Podbielska H., Augustyniak A., Kucińska I., Department of Preclinical Sciences and Infectious Diseases, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Poznań University of Life Sciences.

African swine fever (ASF), is a viral disease of pigs and wild boar that is usually deadly. There are neither vaccines nor cures. African swine fever has got a significant negative impact on the global pig industry. The disease control is based on ensuring biosecurity, early diagnosis and culling pig herds with ASFV infected animals. However, in view of the ease with which ASFV spreads, its high resistance to environmental conditions and the many difficulties related to the introduction of effective specific immunoprophylaxis, this process is extremely difficult. Despite encountering problems such as lack of an animal model other than the natural host, lack of an effective continuous cell line for the isolation and propagation of ASFV, a risk of reversion to virulence, or inability to differentiate infected animals from vaccinated ones, scientists do not stop trying to design an effective vaccine. Recent approaches to ASF vaccine construction have focused on the development of modified live vaccines by targeted gene deletion from different isolates or of subunit vaccines. Here, we discuss current scientific advances and technological progress in this issue. The design of a safe and effective vaccine against ASFV seems to be achievable, nevertheless, a commercial vaccine is unlikely to appear within the next few years.

Keywords: vaccine, African swine fever, immunoprophylaxis.

że zaprojektowanie skutecznej szczepionki może być wykonalne. Jednak przeciwciała indukowane zarówno przez wirusa, jak i antygeny szczepionkowe nie są w pełni zdolne do neutralizacji ASFV. Lokalizacja i funkcja wszystkich komponentów biorących udział w odpowiedzi immunologicznej przeciwko ASFV również nie jest w pełni poznana. Co ciekawe, niektóre badania wykazały, że przeciwciała swoiste dla ASFV oprócz roli ochronnej mogą również powodować zaostrzenie przebiegu choroby i wystąpienie zmian przewlekłych. Jednoczesna obecność wirusa i przeciwciał prowadziła niekiedy do odkładania się kompleksów immunologicznych, czego konsekwencją



Rycina 1. Sytuacja epidemiologiczna w zakresie występowania ASFV na świecie w latach 2020–2022 (wg AFRICAN SWINE FEVER (ASF) – Situation report 9, 07/04/2022; <https://www.oie.int/app/uploads/2022/04/asf-report9.pdf>, data dostępu 11.04.2022)

było uszkodzenie naczyń krwionośnych i powstawanie ognisk martwiczych. Zaostrzenie po podaniu prototypów szczepionek obserwowano również po immunizacji szczepionkami atenuowanymi lub podjednostkowymi. Zjawisko to wymaga dokładniejszych badań. Wyniki dotychczas przeprowadzonych badań sugerują, że szczepionki przeciwko ASF powinny indukować zarówno przeciwciała, jak i odpowiedź komórkową T CD8+, aby zapewnić odpowiednią ochronę. Wiadomo także, że ASFV jest w stanie unikać odpowiedzi immunologicznej gospodarza, negatywnie wpływając na jego układ odpornościowy, co prowadzi do skutecznej replikacji wirusa. Najnowsze podejścia do projektowania szczepionek przeciwko ASFV koncentrują się, z różnymi rezultatami, na opracowaniu zmodyfikowanych, żywych szczepionek poprzez ukierunkowaną delecję genów z różnych izolatów lub szczepionek podjednostkowych.

Żywe szczepionki atenuowane

Żywe szczepionki atenuowane (LAV) mogą być oparte na naturalnie występujących szczepach ASFV o obniżonej zjadliwości lub szczepach zjadliwych atenuowanych. Eksperymentalne LAV, oparte na szczepach wyizolowanych z kleszczy lub naturalnie atenuowanych izolatów pochodzących od przewlekle zakażonych świń, zapewniały homologiczną ochronę, jednak ostateczny wynik i poziom ochrony zależał od kilku zmiennych i ostatecznie nie udało się dotychczas skonstruować zadawalającej szczepionki. W ostatnim czasie nowe technologie, w tym edycja genów czy rekombinacja, stanowią duże ułatwienie w opracowaniu nowych rekombinowanych LAV. Nowo opracowane, obiecujące antygeny dla potencjalnych szczepionek zestawiono w tabeli 1.

Chociaż LAV okazały się obiecujące, warto wspomnieć o możliwości transmisji wirusa szczepionkowego, która może mieć zarówno negatywne, jak i pozytywne skutki w populacji dotkniętej ASF. W badaniach Barasona i wsp. (8) większość kontaktowych zwierząt wskaźnikowych rozwinęła odpowiedź immunologiczną, co sugeruje nie tylko immunogenność szczepionki, ale także możliwość horyzontalnej transmisji wirusa szczepionkowego pomiędzy podanymi osobnikami. Racjonalna delecja genów wirulencji i inhibitorów interferonu wydaje się obiecującą

drogą do uzyskania kandydatów na skuteczną szczepionkę przeciwko ASFV. Geny 9GL (B119L), UK (DP96R), CD2v (EP402R), DP148R i rodziny wielogenowe (MGF) są przykładowymi genami związanymi z wirulencją, które zostały usunięte w różnych badaniach. Delecja genu 9GL (B119L) w wysoce wirulentnych izolatach ASFV Malawi Lil-20/1 (Mal) i Pretoriuskop/96/4 (Δ 9GL) spowodowała całkowitą ochronę przed izolatami rodzicielskimi. Niestety, gdy podobna delecja została użyta do atenuacji ASFV Georgia 2007, atenuacja została osiągnięta, ale dawki ochronne i śmiertelne były podobne. Pełną atenuację uzyskano poprzez dodatkową delecję DP96R.

Niestety delecja nie zawsze przynosi zamierzone efekty. Na przykład zakażenie naturalnie atenuowanym szczepem OURT88/3 wywołuje ochronę przed tymi samymi lub blisko spokrewnionymi szczepami, powodując jednocześnie działania niepożądane. Reis i wsp. (7) podjęli próbę zwiększenia bezpieczeństwa szczepionki poprzez usunięcie genu I329L. Okazało się, że ochrona indukowana przez mutant z delecją OURT88/3 Δ I329L była znacznie słabsza. U zwierząt obserwowano obniżenie poziomu przeciwciał przeciwko białku ASFV VP72/B646L oraz spadek liczby komórek produkujących IFN- γ , natomiast stężenie IL-10 w surowicy zwierząt immunizowanych mutantem OURT88/3 Δ I329L było podwyższone. W tym samym badaniu wykazano również, że delecja genu I329L nie spowodowała osłabienia wirulentnego izolatu Georgia/2007. Inne badania wykazały, że delecja inhibitora IFN (A276R) z izolatu NH/P68 powodowała całkowitą utratę ochrony przed zakażeniem Arm07, w przeciwieństwie do 100% ochrony zapewnianej przez szczepienie dzikim typem ASFV. Kolejnym przykładem nieprzewidywalności manipulacji genetycznych polegających na jednoczesnej delecji wielu genów z genomu ASFV są badania przeprowadzone przez Gladue i wsp. (13). Autorzy wykazali, że delecja genów CD2-podobnych i C-typu lektyny znacząco obniżyła potencjał ochronny szczepu szczepionki eksperymentalnej atenuowanej po delecji 9GL z izolatu Georgia-2010 (ASFV-G- Δ 9GL). Delecja genu CD2-podobnego oraz genu lektyny typu C pozwoliła na uzyskanie szczepów ASFV-G- Δ 9GL/ Δ CD2v oraz ASFV-G- Δ 9GL/ Δ CD2v/ Δ EP153R, zawierających odpowiednio dwie i trzy delecje genowe. Po tych manipulacjach genami, poziomy wirulencji wywołane przez

Tabela 1. Obiecujące prototypy szczepionek przeciwko ASF badane w latach 2015–2021

Nazwa szczepu ASFV	Genotyp	Usunięte geny	Mutant delecyjny	Efekty
Pretoriuskop/96/4	XX	9GL		całkowita ochrona przed izolatami homologicznymi
Malawi Lil 20/1 (Mal)	VIII	9GL		całkowita ochrona przed izolatami homologicznymi
Georgia 2010	II	I177L	ASFV-G- Δ I177L	podanie doustne jest tak samo skuteczne jak podanie i.m., zwierzęta pozostały klinicznie zdrowe po zakażeniu ASFV-G, a swoista odpowiedź humoralna była na tym samym poziomie
HLJ/18	II	MGF505-1R, MGF505-2R, MGF505-3R, MGF360-12L, MGF360-13L, MGF360-14L	HLJ/18-7GD	pełna atenuacja u świń; zapewnienie całkowitej odporności na śmiertelne zakażenie ASFV; brak rewersji do szczepu wirulentnego
OURT 88/3	I	I329L	OURT88/ 3 Δ I329L	hamowanie wrodzonej odpowiedzi immunologicznej gospodarza
L v17 / WB / Rie1217	II			92% ochrona u dzików po zakażeniu wirulentnym izolatem ASF Arm07

ASFV-G- Δ 9GL/ Δ CD2v i ASFV-G- Δ 9GL/ Δ CD2v/ Δ EP153R były prawie niewykrywalne po zaszczepieniu świń, ale szczepionki nie chroniły zwierząt przed zakażeniem rodzicielskim zjadliwym ASFV-Georgia, w przeciwieństwie do ASFV-G- Δ 9GL, który zapewniał silną ochronę przeciwwakacyjną. ASFV-G- Δ 9GL/ Δ CD2v/ Δ EP153R miał również zmniejszoną zdolność do replikacji *in vitro* w hodowlach makrofagów świń w porównaniu do rodzicielskiego ASFV-G- Δ 9GL.

Wyniki powyższe sugerują, że racjonalne opracowywanie nowych szczepionek przeciwko ASFV wymaga dużej ostrożności i unikania bezpośredniego przenoszenia wyników uzyskanych wskutek specyficznej delecji genów w danym szczepie wirusa na nowe izolaty terenowe.

Znaczącym odkryciem ostatnich lat wydaje się atenuowany szczep HLJ/18-7GD skonstruowany przez Chen i wsp. (14). Zgodnie z wynikami badań szczep HLJ/18-7GD, z delecją siedmiu genów, nie był w stanie przekształcić się w szczep wirulentny i zapewniał całkowitą odporność na śmiertelne zakażenie ASFV u świń. Wspomniane badanie daje obiecujące wyniki dla możliwości opracowania skutecznej szczepionki, jednakże posiada też ważne ograniczenia, utrudniające wiarygodną ocenę jego wartości. Autorzy nie opublikowali całej sekwencji delecyjnego szczepu. Nie przeprowadzili też długoterminowych (powyżej miesiąca) badań w aspekcie braku wirerii po zakażeniu szczepem terenowym świń zaszczepionych. W 2015 r. O'Donnell i wsp. (15) zaproponowali podobną kombinację delecji i otrzymali rekombinowany wirus ASFV-G- Δ MGF pochodzący z wysoce wirulentnego izolatu ASFV Georgia 2007. Była to pierwsza eksperymentalna szczepionka, która wywołała ochronę u świń zakażonych wysoce zjadliwym ASFV Georgia 2007 i wykazała rolę genów MGF w wirulencji ASFV. Badacze usunęli sześć genów należących do MGF360 lub MGF505: MGF505-1R, MGF360-12L, MGF360-13L, MGF360-14L, MGF505-2R i MGF505-3R. Świnie zaszczepione domięśniowo ASFV-G- Δ MGF nie wykazywały objawów choroby. Po zakażeniu wysoce zjadliwym szczepem rodzicielskim ASFV u zwierząt nie wystąpiły objawy kliniczne, chociaż u części z nich wykrywano wirusa.

W badaniu Chen i wsp. (14) jako podstawę do opracowania żywej atenuowanej szczepionki wybrano szczep Pig/Heilongjiang/2018 (HLJ/18), pierwszy chiński izolat ASFV. W badaniu tym stworzono sześć mutantów poprzez usunięcie segmentów genów kodujących od jednego do siedmiu różnych białek, które wcześniej okazały się niezbędne dla wirulencji różnych szczepów ASFV. Najważniejszy z pozbawionych genów wirusów został określony jako HLJ/18-7GD (usunięto geny kodujące MGF505-1R, MGF505-2R, MGF505-3R, MGF360-12L, MGF360-13L, MGF360-14L, CD2v). Aby ocenić skuteczność delecji, świnie zostały zakażone domięśniowo i doustnie wirulentnym szczepem ASFV. Wszystkie zaszczepione świnie przeżyły 3-tygodniowy okres obserwacji. Niski poziom wirusowego DNA potwierdzono w węzle chłonny w jednej świni w grupie zakażanej domięśniowo. Wirusowe DNA nie zostało wykryte u żadnej ze świń w grupie zakażanej doustnie. Oceniono również czas

trwania ochrony po podaniu tej szczepionki, zakażając świnie 10 tygodni po szczepieniu. Stwierdzono, że wszystkie zaszczepione świnie pozostały klinicznie zdrowe i przeżyły okres obserwacji, a u większości świń nie wykryto materiału genetycznego wirusa. Jest możliwe, że długotrwała odporność indukowana przez pojedynczą dawkę HLJ/18-7GD zapewni solidną ochronę przed ekspozycją na śmiertelny ASFV, a dwie dawki HLJ/18-7GD mogą odpowiednio chronić świnie przez całe życie. W powyższym badaniu oceniano również bezpieczeństwo podawania HLJ/18-7GD u ciężarnych loch. Lochy były szczepione HLJ/18-7GD w 35., 63. i 94. dniu ciąży i monitorowane do 4 tygodni po porodzie. Wszystkie lochy pozostały klinicznie zdrowe i urodziły prosięta w oczekiwanych terminach, co wskazuje, że szczepienie HLJ/18-7GD nie wywołuje negatywnych skutków u ciężarnych loch i nie wpływa na zdrowie prosiąt. Wyniki te sugerują, że szczepionka oparta na HLJ/18-7GD ASFV jest zarówno bezpieczna, jak i skuteczna i może odegrać kluczową rolę w ograniczaniu rozprzestrzeniania się wirusa w przyszłości.

Pomimo bardzo obiecujących wyników powyższych badań szczepionka HLJ/18-7GD może okazać się nieskuteczna w Europie, gdzie poważnym problemem są zakażenia u dzików. Aby HLJ/18-7GD mógł zostać wprowadzony na rynek europejski, konieczne są szeroko zakrojone badania. Szczep ten musiałby zapewniać ochronę przed wariantami wirusa krążącymi w Europie, potrzebne są również badania potwierdzające brak powstawania nosicielstwa po podaniu szczepionki. Co ważne, szczepionka ta wymaga oceny skuteczności i bezpieczeństwa po podaniu *per os* u dzików, co jest kluczowym czynnikiem dla eradykacji choroby.

Inny obiecujący kandydat na szczepionkę LAV został zaproponowany przez Borca i wsp. (16, 17). Autorzy odkryli, że usunięcie genu I177L z ASFV skutkuje odpornością przeciwko ASFV. Zgodnie z wynikami badań usunięcie nieznanego wcześniej genu I177L z wysoce patogenego szczepu ASFV Georgia 2010 (ASFV-G) spowodowało jego pełną atenuację. W tym badaniu świnie zaszczepione różnymi dawkami szczepu ASFV-G- Δ I177L pozostały klinicznie zdrowe przez 28 dni obserwacji, niezależnie od dawki szczepionki. U zaszczepionych zwierząt obserwowano niewielką wiramię, ale nie wykazywały one objawów klinicznych ASF. Zwierzęta zaszczepione domięśniowo szczepem ASFV bez genu I177L wytworzyły silną odpowiedź humoralną, będąc w pełni chronione przed zakażeniem zjadliwym rodzicielskim ASFV-G przez 28-dniowy okres obserwacji. Dodatkowo, nie zaobserwowano siewstwa wirusa, co wskazuje, że przeniesienie ASFV-G- Δ I177L z zakażonych zwierząt na zwierzęta naiwne jest mało prawdopodobne. ASFV-G- Δ I177L jest jednym z niewielu współczesnych szczepów kandydujących do szczepionki, w przypadku którego wykazano, że wywołuje ochronę przed izolatem ASFV Georgia, a także pierwszym zdolnym do wywołania sterylnej odporności przeciwko szczepowi ASFV, który jest odpowiedzialny za aktualną pandemię. Ponieważ delecja jakichkolwiek innych genów w innych izolatach ASFV nie zdołała skutecznie hamować ASFV

Georgia, odkrycie supresji poprzez delecję genu I177L jest zaskakujące, nawet jeśli szlaki gospodarza, które pośredniczą w obronie przed zakażeniem ASFV są nadal przedmiotem dyskusji.

Szczepionki wektorowe i szczepionki podjednostkowe

Istotą szczepionek wektorowych jest włączenie do genomu wektora genów pochodzących z drobnoustroju chorobotwórczego. Geny, pochodzące z drobnoustrojów chorobotwórczych, zaczynają kodować antygeny ochronne. Bezpieczeństwo w tego typu szczepionkach zapewnia się poprzez usunięcie lub zastąpienie genów wirulencji lub poprzez uniemożliwienie replikacji wektora wirusowego. Co ważne dla przyszłego rozwoju szczepionki przeciwko ASFV, wektory wirusowe umożliwiają kodowanie immunogenów, które mogą służyć jako markery szczepionkowe, pozwalające na odróżnienie zwierząt zakażonych od zaszczepionych. Dotychczas w badaniach doświadczalnych jako wektory rekombinowanych żywych szczepionek wektorowych ASFV stosowano wirus choroby Aujeszkiego, alfawirusy i adenowirusy (18).

W 2013 r. BacMam-sHAPQ, wektor oparty na bakulowirusie, został wykorzystany do dostarczenia świniom konstruktowi fuzyjnego sHA/p54/p30 i zapewnił ochronę przed subletalnymi dawkami ASFV u czterech z sześciu świń. Trzy lata później oceniano rekombinowany wirus choroby Newcastle (rNDV) z ekspresją białka 72 ASFV (p72). Ostatnio Feng i wsp. (19) skonstruowali atenuowany szczep wirusa choroby Aujeszkiego z ekspresją białka ASFV CD2v (PRV-ΔgE/ΔgI/ΔTK- (CD2v)) za pomocą technologii CRISPR/Cas9 i indukowali swoistą dla CD2v humoralną i komórkową odpowiedź immunologiczną u myszy. Konieczne są dalsze badania, aby potwierdzić skuteczność tych zmodyfikowanych szczepów u świń i ocenić ich potencjał w zapobieganiu ASF u świńiowatych.

Szczepionki podjednostkowe zawierają wyłącznie oczyszczone, immunogenne antygeny, które wchodzi w skład komórek drobnoustrojów chorobotwórczych i specyficznie stymulują układ odpornościowy do wytwarzania swoistych przeciwciał. Szczepionki te są najczęściej oparte na białkach, peptydach lub polisacharydach, które zawierają immunogenne epitopy wywołujące odpowiedź immunologiczną. Znaczenie skutecznego antygeny dla szczepionki podjednostkowej nie jest proste. Jak wcześniej sądzono, ASFV nie jest zdolny do indukowania przeciwciał neutralizujących, natomiast wiele dekad badań nad surowicą świń rekonwalescentów pozwoliło na odkrycie i opisanie kilku białek ASFV (p30, p54, p72, CD2v, EP153R, p12, D117L, pp62). P72, P30 i P54 są uważane za najbardziej znaczące białka antygenowe, które wywołują humoralną odpowiedź immunologiczną podczas infekcji. Adsorpcja wirusa może być blokowana przez przeciwciała przeciwko P72 i P54, a endocytoza wirusa może być zachowana dzięki przeciwciałom przeciwko P30. Odkrycia te doprowadziły do dużego zainteresowania badaniami nad szczepionkami podjednostkowymi. Niestety w niektórych

badaniach nie udało się odtworzyć ochrony zapewnianej przez te białka w innych modelach zakaźnych, a ich zastosowanie w doświadczeniach ze szczepionkami przeciwko wirulentnym szczepom ASFV nie przyniosło znaczących efektów.

W 2020 r. Urbano i Ferreira zaproponowali nowe białko ASFV, które może mieć potencjał do wykorzystania w projektowaniu szczepionek podjednostkowych. pA104R jest jednym z białek, które wcześniej okazały się głównym celem odporności humoralnej u świń. Białko to wydaje się głęboko zaangażowane w przestrzenną organizację genomu ASFV. Odpowiedź przeciwciał na pA104R jest wyższa u zwierząt bezobjawowych niż u przewlekle zakażonych, stąd przeciwciała przeciwko temu białku mogą być wskaźnikiem skutecznej odpowiedzi immunologicznej i prawdopodobnie biorą udział w ochronie przeciwzakaźnej. Urbano i Ferreira sugerują, że pA104R może być wykorzystane w przyszłych szczepionkach podjednostkowych i ma potencjał do zapewnienia skutecznej ochrony.

Szczepionka przeciwko ASF – trudności i ograniczenia

Afrykański pomór świń i dziki

Wirus afrykańskiego pomoru świń jest patogenny jedynie dla świń domowych i dzikich, co może stanowić ograniczenie w pracach nad uzyskaniem nieszkodliwej i skutecznej szczepionki przeciwko ASF ze względu na brak modelu zwierzęcego innego niż naturalny gospodarz. Wprowadzenie do powszechnego użytku skutecznej szczepionki jest szczególnie ważne w przypadku dzików. Dzikie są wysoce podatne na ASF. Jednocześnie gatunek ten uważany jest za najgroźniejsze źródło ASFV w Europie (za życia i po śmierci). Prawie we wszystkich krajach europejskich dotkniętych do tej pory ASF choroba ta została wprowadzona do kraju, a następnie do populacji świń domowych bezpośrednio lub pośrednio przez dziki. Obecnie zapobieganie rozprzestrzenianiu się ASF poprzez dziki uzyskuje się poprzez zmniejszenie zagęszczenia populacji dzików oraz usuwanie padliny. Jednak, jak podaje Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA), kontrolowanie liczebności populacji dzików jedynie poprzez ich odstrzał nie zawsze przynosi oczekiwane rezultaty. W większości krajów europejskich populacja tego gatunku zwierząt rośnie w wielu regionach mimo pojawienia się ASF.

Szczepionki przeznaczone dla dzików powinny być testowane ściśle na tym gatunku. Wskazane jest, aby były podawane w formie kęsów i aby były dostępne dla dzików w naturalnym środowisku. Niestety większość badań opublikowanych do tej pory dotyczy szczepionek podawanych w iniekcji. Biorąc to wszystko pod uwagę, szanse na ograniczenie rozprzestrzeniania się ASFV wśród dzików poprzez szczepienia są bardzo ograniczone. W ciągu najbliższych kilku lat taki scenariusz jest mało realny. Przeprowadzono niewiele badań dotyczących doustnego uodporniania dzików. Pierwsze doniesienie na temat

eksperymentalnego szczepienia dzików przeciwko genotypowi II ASFV, a także pierwsze badanie dotyczące doustnej immunizacji przeciwko jakiegokolwiek szczepowi ASFV u dzików zostały opublikowane w 2019 r. przez Barasona i wsp. (8). Zastosowanie naturalnie atenuowanego izolatu ASFV (Lv17/WB/Riel217) zapewniło 92% ochronę po inokulacji wirulentnym izolatem wirusa ASF (Arm07). U żadnego z zaszczepionych zwierząt nie wystąpiły objawy kliniczne ani poważne działania niepożądane. Jednakże do badań użyto małej grupy zwierząt (12 zwierząt). Badania wykazały, że zwierzęta szczepione doustnie mogą wydalać wirusa szczepionkowego, co z jednej strony może przyczynić się do zwiększenia zasięgu szczepień, zmniejszając potrzebę kosztownej produkcji na dużą skalę i podawania szczepionek w terenie. Z drugiej strony, wydalanie wirusa szczepionkowego może oznaczać, że dziki mogą być trwałymi nośicielami wirusa i stwarza ryzyko przedostania się wirusa szczepionkowego do środowiska.

Jak wspomniano wcześniej, ASFV-G- Δ I177, uzyskany poprzez delecję genu I177L z genomu ASFV-G, okazał się bezpieczny i wysoce skuteczny w badaniach z użyciem rodzicielskiego ASFV-G. Borca i wsp. w 2021 r. przeprowadzili nowe badania, w których podawali ten szczep drogą oronaszalną (ON) i uzyskali podobną skuteczność jak w przypadku podawania domięśniowego (17). Podanie drogą ON wysokiej dawki ASFV-G- Δ I177L nie powodowało pojawienia się objawów klinicznych ASFV. Zwierzęta zaszczepione ON pozostały klinicznie zdrowe po zakażeniu zjadliwym izolatem ASFV-G. Ponadto miana swoistych przeciwciał obserwowane u zwierząt zaszczepionych drogą ON lub domięśniowo nie różniły się. ASFV-G- Δ I177L jest zatem skuteczny zarówno po podaniu ON, jak i domięśniowo po zakażeniu zjadliwym rodzicielskim ASFV-G. Co ważne, badacze sugerują, że zwierzęta zaszczepione ON nie siałą wystarczającej ilości wirusa, aby zakażać naiwne świnię podczas 28 dni obserwacji. Fakty te wskazują, że podawanie ASFV-G- Δ I177L doustnie jest bezpieczne i ułatwia potencjalne zastosowanie tej szczepionki w populacjach dzikich świń.

Brak ustalonej linii komórkowej makrofagów

Postęp w opracowaniu szczepionki jest utrudniony przez brak ciągłej linii komórkowej służącej do namnażania wirusa, która byłaby odpowiednio wrażliwa na ASFV, przy jednoczesnym unikaniu dalszych zmian genetycznych w obrębie genomu ASFV. Ustalona, licencjonowana linia komórkowa makrofagów świń jest niezbędna do namnażania LAV ASFV. Używanie pierwotnych makrofagów jest pracochłonne i kosztowne oraz budzi wątpliwości natury etycznej. Wymienione przeszkody zostały częściowo pokonane przez adaptację kilku wirulentnych izolatów terenowych do wzrostu w komórkach Vero lub MS, chociaż po adaptacji w izolatach obserwowano zmiany genomu. Trudno ocenić skutki tych i innych potencjalnych mutacji punktowych obserwowanych podczas adaptacji ASFV do komórek Vero, które mogą powodować zmiany fenotypowe wirusa. ASFV-G- Δ I177L okazał się

bezpieczny i wysoce skuteczny w badaniach prowokacyjnych z użyciem rodzicielskiego ASFV-G – w badaniach opisanych wcześniej przez Borca i wsp. (20). Jednak efektywna replikacja tego szczepu szczepionkowego była możliwa tylko w pierwotnych makrofagach świń, co ograniczało produkcję na dużą skalę. Ostatnio ten sam zespół badawczy zaproponował szczep pochodny ASFV-G- Δ I177L z delecją w lewym regionie zmiennym (ASFV-G- Δ I177L/ Δ LVR), który skutecznie replikuje się w linii komórkowej. Delecja ta pozwala na wzrost w hodowlach przy zachowaniu siły działania i skuteczności macierzystego szczepu szczepionki. ASFV-G- Δ I177L/ Δ LVR zachował ten sam poziom atenuacji, właściwości immunogenne i skuteczność ochronną, co wcześniej prezentowany ASFV-G- Δ I177L. Odkrycie to pozwala na pokonanie jednej z głównych przeszkód w produkcji szczepionki przeciwko wirusowi ASF, która zależy od produkcji szczepionki w pierwotnych makrofagach świń. ASFV-G- Δ I177L/ Δ LVR jest pierwszym kandydatem na szczepionkę przeciwko ASF, który pozwala na zachowanie właściwości izolatu przy jednoczesnej replikacji szczepionki w hodowlach komórkowych w warunkach laboratoryjnych i komercyjnej produkcji szczepionki na dużą skalę.

Bezpieczeństwo szczepionki

Kolejnym ważnym aspektem jest bezpieczeństwo szczepionki. Głównym problemem związanym z LAV jest możliwość rewersji wirusa szczepionkowego do wersji zjadliwej podczas replikacji u zaszczepionych zwierząt. Poprzednio opracowane żywe szczepionki przeciwko ASFV, atenuowane przez seryjne pasażowanie w hodowli komórkowej lub przez użycie naturalnie wyizolowanych szczepów awirulentnych, ulegały właśnie takiej rewersji i powodowały 10–50% śmiertelność podczas stosowania u świń hodowlanych w Portugalii i Hiszpanii w latach 60. XX wieku. Z powodu powikłań poszczepiennych szczepionki z tej grupy zostały wycofane z rynku w tych krajach i nigdy więcej nie były stosowane. Negatywny scenariusz związany z rewersją do szczepu wirulentnego obserwowano również w przypadku szczepionek przeciwko PRRS. Badanie przeprowadzone przez Chen i wsp. (14) potwierdza taką możliwość. Szczep HLJ/18-6GD, w którym usunięto sześć genów (MGF505-1R, MGF505-2R, MGF505-3R, MGF360-12L, MGF360-13L, MGF360-14L), może stać się bardziej zjadliwy podczas replikacji u świń. Na przykład wszystkie pięć świń, którym podawano HLJ/18-6GD po szóstym pasażu, wykazywało znaczące ilości kopii wirusowego DNA we krwi i narządach. HLJ/18-6GD wykazał potencjał, aby stać się bardziej zjadliwy podczas replikacji, co jest niewątpliwie niepokojące. Mechanizmy, dzięki którym do tego doszło, nie zostały jeszcze poznane. Dodatkowo nie można wykluczyć możliwości zakażenia zaszczepionych zwierząt szczepem terenowym ASFV. Włączenie genów kodujących wirulencję szczepu terenowego do genomu szczepu szczepionkowego może skutkować zwiększeniem wirulencji szczepu szczepionkowego i zachorowaniami u zaszczepionych świń.

Pomimo korzyści wynikających z delecji genów wirulencji usunięcie genów odpowiedzialnych za wirulencję z genomu potencjalnego kandydata na antygen szczepionkowy w większości przypadków powoduje jednoczesne osłabienie jego immunogenności, co może być związane z wzajemnymi interakcjami w genomie. W ten sposób, uzyskując szczepionkę bez ryzyka wywołania skutków ubocznych, otrzymuje się biopreparat o niskiej skuteczności.

Strategia DIVA

Brak strategii DIVA w odniesieniu do potencjalnych szczepionek ASF jest kolejną przeszkodą w eliminacji ASF poprzez immunizację. Potencjalny produkt stosowany w terenie musi spełniać szereg wymogów, w tym skuteczność oraz zastosowanie markerów różnicujących zwierzęta zakażone od szczepionych. Technika DIVA pozwala na odróżnienie zwierząt zaszczepionych przeciwko ASF od zwierząt zakażonych szczepem terenowym i jest niezbędna w przypadku skutecznego monitorowania eradykacji choroby. Duże nadzieje związane z DIVA przypisuje się szczepionkom podjednostkowym i wektorowym z wieloma antygenami immunodominującymi, pozwalającymi na diagnostykę różnicową.

Podsumowanie

Od kilkudziesięciu lat podejmowane są próby opracowania odpowiedniej i skutecznej szczepionki przeciwko ASF, jednak jak dotąd okazały się one nieskuteczne. Wysiłki te są komplikowane przez wiele aspektów: świnie, które przeżyły, są chronione co najwyżej przed zakażeniem tylko homologicznym szczepem wirusa, a odporność krzyżowa jest trudna do osiągnięcia. Ponadto nie zidentyfikowano ostatecznie elementów odpornościowych odpowiedzialnych za ochronę przed zakażeniem ASFV, a antygeny wirusowe związane z odpornością przeciwważną są nadal nieznanne. Obecnie największe nadzieje wiąże się z rekombinowanymi żywymi szczepionkami atenuowanymi oraz postępem badań w sektorze szczepionek podjednostkowych, szczepionek DNA i szczepionek wektorowych. Ostatnie obiecujące wyniki dają nadzieję na wdrożenie skutecznej szczepionki przeciwko ASFV. Problemem w większości krajów europejskich jest duży udział dzikich świńniowatych w rozprzestrzenianiu wirusa, dlatego też opracowanie szczepionek doustnych wydaje się najbardziej obiecującym rozwiązaniem.

Piśmiennictwo

1. Pejsak Z., Niemczuk K., Frant M., Mazur M., Pomorska-Mól M., Ziętek-Barszcz A., Bocian Ł., Łyjak M., Borowska D., Woźniakowski G.: Four years of African swine fever in Poland. New insights into epidemiology and prognosis of future disease spread. *Pol. J. Vet. Sci.* 2018, **21**, 835–841.
2. Śmietanka K., Woźniakowski G., Kozak E., Niemczuk K., Frączyk M., Bocian Ł., Kowalczyk A., Pejsak Z.: African Swine Fever Epidemic, Poland, 2014–2015. *Emerg. Infect. Dis.* 2016, **22**, 1201–1207.
3. European Food Safety Authority (EFSA), Nielsen S.S., Alvarez J., Bicoût D.J., Calistri P., Depner K., Drewe J.A., Garin-Bastuji B., Gonzales Rojas J.L., Gortázar Schmidt C., Herskin M., Michel V., Pasquali P., Roberts H.C., Sihvonen L.H.; Spooler H.; Stahl K., Velarde A.,

- Winckler C., Blome S., Boklund A., Bøtner A., Dhollander S., Van der Stede Y., Miranda Chueca M.A.: Research priorities to fill knowledge gaps on ASF seasonality that could improve the control of ASF. *EFSA J.* 2021, **19**, e06550.
4. Sánchez-Vizcaino J.M., Mur L., Bastos A.D., Penrith M.L.: New insights into the role of ticks in African swine fever epidemiology. *Rev. Sci. Tech.* 2015, **34**, 503–511.
 5. Blome S., Franzke K., Beer M.: African swine fever - A review of current knowledge. *Virus Res.* 2020, **287**, 198099.
 6. Portugal R., Coelho J., Höper D., Little N.S., Smithson C., Upton C., Martins C., Leitão A., Keil G.M.: Related strains of African swine fever virus with different virulence: genome comparison and analysis. *J. Gen. Virol.* 2015, **96**, 408–419.
 7. Reis A.L., Goatley L.C., Jabbar T., Lopez E., Rathakrishnan A., Dixon L.K.: Deletion of the Gene for the Type I Interferon Inhibitor I329L from the Attenuated African Swine Fever Virus OURT88/3 Strain Reduces Protection Induced in Pigs. *Vaccines*. 2020, **8**, 262.
 8. Barasona J.A., Gallardo C., Cadenas-Fernández E., Jurado C., Rivera B., Rodríguez-Bertos A., Arias M., Sánchez-Vizcaino J.M.: First Oral Vaccination of Eurasian Wild Boar Against African Swine Fever Virus Genotype II. *Front. Vet. Sci.* 2019, **6**, 137.
 9. Netherton C.L., Goatley L.C., Reis A.L., Portugal R., Nash R.H., Morgan S.B., Gault L., Nieto R., Norlin V., Gallardo C., Ho C.-S., Sánchez-Cordón P.J., Taylor G., Dixon L.K.: Identification and immunogenicity of African swine fever virus antigens. *Front. Immunol.* 2019, **19**, 1318.
 10. Lopez E., van Heerden J., Bosch-Camós L., Accensi F., Navas M.J., López-Monteagudo P., Argilagué J., Gallardo C., Pina-Pedrero S., Salas M.L., Salt J., Rodríguez F.: Live Attenuated African Swine Fever Viruses as Ideal Tools to Dissect the Mechanisms Involved in Cross-Protection. *Viruses*. 2020, **12**, 1474.
 11. Dixon L.K., Islam M., Nash R., Reis A.L.: African swine fever virus evasion of host defences. *Virus Res.* 2019, **266**, 25–33.
 12. 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.
 13. Gladue D.P., O'Donnell V., Ramirez-Medina E., Rai A., Pruitt S., Vuono E.A., Silva E., Velazquez-Salinas L., Borca M.V.: Deletion of CD2-Like (CD2v) and C-Type Lectin-Like (EP153R) Genes from African Swine Fever Virus Georgia-Δ9GL Abrogates Its Effectiveness as an Experimental Vaccine. *Viruses*. 2020, **12**, 1185.
 14. Chen W., Zhao D., He X., Liu R., Wang Z., Zhang X., Li F., Shan D., Chen H., Zhang J., Wang L., Wen Z., Wang X., Guan Y., Liu J., Bu Z.: A seven-gene-deleted African swine fever virus is safe and effective as a live attenuated vaccine in pigs. *Sci. China Life Sci.* 2020, **63**, 623–634.
 15. O'Donnell V., Holinka L.G., Gladue D.P., Sanford B., Krug P.W., Lu X., Arzt, J., Reese B., Carrillo C., Risatti G.R., Borca M.V.: African Swine Fever Virus Georgia Isolate Harboring Deletions of MGF360 and MGF505 Genes Is Attenuated in Swine and Confers Protection against Challenge with Virulent Parental Virus. *J. Virol.* 2015, **89**, 6048–6056.
 16. Borca M.V., Ramirez-Medina E., Silva E., Vuono E., Rai A., Pruitt S., Holinka L.G., Velazquez-Salinas L., Zhu J., Gladue D.P.: Development of a highly effective African swine fever virus vaccine by deletion of the I177L gene results in sterile immunity against the current epidemic Eurasia strain. *J. Virol.* 2020, **94**, e02017–19.
 17. Borca M.V., Ramirez-Medina E., Silva E., Vuono E., Rai A., Pruitt S., Espinoza N., Velazquez-Salinas L., Gay C.G., Gladue D.P.: ASFV-ΔI177L as an Effective Oral Nasal Vaccine against the Eurasia Strain of African Swine Fever. *Viruses*. 2021, **13**, 765.
 18. Goatley L.C., Reis A.L., Portugal R., Goldswain H., Shimmion G.L., Hargreaves Z., Ho C.-S., Montoya M., Sánchez-Cordón P.J., Taylor G., Dixon L.K., Netherton C.L.: A Pool of Eight Virally Vectors of African Swine Fever Antigens Protect Pigs against Fatal Disease. *Vaccines (Basel)*. 2020, **8**, 234.
 19. Feng Z., Chen J., Liang W., Chen W., Li Z., Chen Q., Cai S.: The recombinant pseudorabies virus expressing African swine fever virus CD2v protein is safe and effective in mice. *Virol. J.* 2020, **17**, 180.
 20. Borca M.V., Rai A., Ramirez-Medina E., Silva E., Velazquez-Salinas L., Vuono E., Pruitt S., Espinoza N., Gladue D.P.: A cell culture-adapted vaccine virus against the current epidemic African swine fever virus strain. *J. Virol.* 2021, **24**, e0012321.

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