

Koronawirusowy zespół ostrej biegunki świń

Zdzisław Gliński, Andrzej Żmuda

z Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w Lublinie

Koronawirusy człowieka: zespół ciężkiej ostrej niewydolności oddechowej (SARS), bliskowschodni zespół niewydolności oddechowej (MERS) i ostatnio szalejąca pandemia COVID-19 wywołana przez koronawirus SARS-CoV-2 (1) wzbudziły, oprócz ogromnego strachu, zainteresowanie chorobami zwierząt, które wywołują koronawirusy, możliwością przeniesienia zakażenia ze zwierząt na człowieka oraz ich szerzenia się w populacji ludzkiej, czego następstwem mogą być nowe epidemie i pandemie. Jedną z nowo pojawiających się chorób koronawirusowych jest koronawirusowy zespół ostrej biegunki prosiąt (SADS-CoV) określanej też jako chiński zespół ostrej biegunki koronawirusowej świń (Chinese swine acute diarrhea syndrome coronavirus), jelitowy alfa-koronawirus świń (SeACoV, swine enteric alphacoronavirus; 2), jelitowy alfa-koronawirus prosiąt (PEAW, porcine enteric alphacoronavirus; 3).

Epidemiologia

SADS-CoV (*Coronaviridae*; *Alpha-coronavirus*; 3) wywołuje zespół SADS, który cechują ciężka ostra, często kończąca się śmiercią biegunka i wymioty. Chorują przede wszystkim prosięta. Śmiertelność u prosiąt 5-dniowych lub młodszych wynosi 90%, natomiast u prosiąt w wieku ponad 8 dni śmiertelność nie przekracza 5%. U macior występuje tylko biegunka o niewielkim nasileniu i wyzdrowienie następuje w ciągu 2 dni. Zarówno chore prosięta, jak i dorosłe świnię nie gorączkują.

Koronawirus SADS-CoV po raz pierwszy zidentyfikowano w 2004 r. u nietoperzy z gatunku podkowiec małe (*Rhinolophus*, rodzina podkowcowate) w Chinach w prowincji Guangdong. Pierwsze zachorowania u prosiąt wystąpiły w grudniu 2016 r., zaś przyczynę choroby ustalono w pierwszej połowie 2017 r. (2). Obecność SADS-CoV zidentyfikowano testem qPCR w jelitach cienkich chorych zwierząt, przy czym wirus replikował się w wyższych mianach u prosiąt aniżeli u osobników dorosłych. Ogółem w czterech fermach padło 24 693 prosiąt. (4). Genom nowo odkrytego wirusa wykazuje 98,48% identyczności z genomem koronawirusa nietoperzy żyjących w jaskini w sąsiedztwie fermy świń (HKU2), który zakaża prosięta przez przewód pokarmowy. SADS-CoV cechuje się większym podobieństwem z pokrewnymi koronawirusami (SADSr-CoV) występującymi u nietoperzy *Rhinolophus affinis*, aniżeli z izolowanymi od nietoperzy *R. sinicus*. Analiza filogenetyczna oraz analizy haplotypu wykazały, że wirusy izolowane z czterech ferm świń pochodziły z rezerwarów, jakimi są nietoperze, przy czym transfer wirusa był albo wielokrotny lub nastąpił tylko jeden raz, a później miało miejsce jego rekombinacja genetyczna (4).

Swine acute diarrhea syndrome coronavirus (SADS-CoV)

Gliński Z., Żmuda A., Faculty of Veterinary Medicine, University of Life Sciences in Lublin

Swine acute diarrhea syndrome coronavirus (SADS-CoV), a newly emerging enteric coronavirus in China, is associated with swine acute diarrhea syndrome (SADS), which has caused significant economic losses to the porcine industry. SADS-CoV has a very broad species tropism *in vitro* and can infect cell lines from 24 different animal species. Moreover, virus transmission, replication and *in vitro* gene expression is possible in on human cells of the liver, gut, and airway origin. Interestingly, none of the known human coronavirus receptors functions as a receptor for SADS-CoV. Also, SADS-CoV infection has not induced IFN- β . Bats are considered to play an important role in epidemiology of swine disease. It is possible, that as bats prey on insects near pig facilities, their feces containing bat-HKU2-like porcine CoVs, contaminate swine feed, which is then eaten by pigs and rodents, that subsequently become carriers of SADS-CoV. The zoonotic transmission of novel coronaviruses into humans presents severe threats to the global health.

Keywords: SADS-CoV, emerging coronaviruses, pig, bat.

Właściwości SADS-CoV

Koronawirus SADS-CoV jest alfa-koronawirusem (*Coronaviridae*, rząd *Nidovirales*) o jednopasmowym genomie zbudowanym z RNA, polaryzacji dodatniej wielkości 26–32 kb (5). Sferyczny wirion o średnicy 100–120 nm z białkową osłonką i maczugowatymi wypustkami (12–24 nm) przypomina koronę słoneczną. Genom koduje 16 białek niestrukturalnych oraz białka strukturalne: białko S (~150 kDa) zlokalizowane na wypustkach, które indukują tworzenie przeciwciał zubożających wirus, decyduje ono o patogenności i przynależności serotypowej wirusa, białko osłonki E (~8–12 kDa), glikoproteinę M (~25–30 kDa) związaną z błoną komórkową oraz zlokalizowaną wewnątrz wirionu nukleoproteinę N tworzącą nukleokapsyd. N-terminalna domena glikoproteiny S cechuje się strukturalnym podobieństwem do domeny 0 alfa-koronawirusa, natomiast pozostała część glikoproteiny S odpowiada strukturze domen B i D beta-koronawirusów. Domena 0 SADS-CoV o dużej zmienności odpowiada za tropizm wirusa do nabłonka przewodu pokarmowego i zawiera 75 aminokwasowych substitucji i 2 aminokwasowe insercje, podobnie jak szczep HKU2, które prawdopodobnie odpowiadają za liczbę gatunków atakowanych przez wirus lub za przekroczenie bariery międzygatunkowej (2). Koronawirusy ulegają łatwo inaktywacji pod wpływem detergentów, wysuszenia i działania promieni słonecznych.

Chorobotwórczość SADS-CoV

Efekt zakażenia przez przewód pokarmowy jest silniejsza replikacja wirusa w odcinku tylnym jelit cienkich, jelicie grubym i w śledzionie. Oprócz zakażenia fekalno-oralnego jest także możliwe zakażenie przez układ oddechowy (6). U prosiąt rozwija się wodnista biegunka, szybko spada masa ciała i rozwijają się zmiany w jelitach cienkich polegające na daleko posuniętym zaniku kosmków jelitowych, włóściczków i naczyń limfatycznych w kosmkach jelita krętego i jelita biodrowego. Tego typu zmiany są słabo zaznaczone w dwunastnicy. Białko N wirusa występuje głównie w komórkach nabłonka jelit cienkich.

Mechanizm działania SADS-CoV na poziomie molekularnym badano w zakażonej hodowli komórek nabłonka jelit cienkich prosięcia (IPEC-12). Wrodzona odporność nieswoista jest pierwszą linią obrony w zakażeniach wirusowych, w której ważną rolę odgrywają interferony IFN- α/β . Koronawirusy dysponują różnymi strategiami w celu uniknięcia działania układu odpornościowego i zakażenia komórek organizmu. Infekcja SADS-CoV nie indukuje ekspresji IFN- β , a przeciwnie hamuje produkcję tego interferonu zainicjowaną przez kwas polizynowo-policytydylowy (poly I:C) lub zakażeniem wirusem Sendai (SeV). Ten mechanizm unikania działania mechanizmów odporności naturalnej polega na przerwaniu szlaku sygnałowego RIG-1 przez inaktywowanie IPS-1, zaburzenie aktywacji IRF, co w efekcie prowadzi do zahamowania ekspresji IFN- β . RIG-1 należy do rodziny cytoplazmatycznych helikaz, które rozpoznają wewnątrzkomórkowy jednoniciowy oraz dwuniciowy RNA wprowadzony do cytozolu podczas zakażenia i replikacji wirusa. IPS-1 jest białkiem stymulującym promotor IFN- β , zaś IRF jest czynnikiem regulacyjnym genu kodującego IFN (7). SADS-CoV blokuje fosforylację i translokację jądrową IRF3 i NF- κ B (kompleks białkowy działający jako czynnik transkrypcyjny).

Możliwość przekroczenia bariery międzygatunkowej przez SADS-CoV

Odpowiedź na pytanie o możliwość przekroczenia przez SADS-CoV bariery międzygatunkowej oraz zakażenia różnych gatunków zwierząt i człowieka starano się uzyskać w badaniach nad charakterem receptora błonowego umożliwiającego zakażenie komórki gospodarza replikacją wirusa w różnych typach hodowli komórkowych pochodzących od zwierząt i człowieka, a także nad drogami szerzenia się zakażenia w warunkach naturalnych.

Okazało się, że SADS-CoV nie wykorzystuje żadnego ze znanych receptorów komórkowych używanych przez inne koronawirusy do zakażenia komórek gospodarza. Enzym konwertujący angiotensynę 2 (ACE2) jest receptorem dla koronawirusów pokrewnych z SARS (SARS-related CoV; 8), aminopeptydaza N (APN) dla niektórych alfa-koronawirusów, np. koronawirusa człowieka HCoV-229E, zaś dipeptydyl peptydaza 4 (DDP4) jest receptorem dla MERS-CoV i wirusa zapalenia mózgu i mięśnia sercowego (EMC) człowieka (9). Do zakażenia komórek wykorzystuje

on inny receptor błonowy występujący u nietoperzy, świni, kur, mały i człowieka. Przemawia za tym replikacja SADS-CoV w hodowlach komórek 20 gatunków zwierząt i 4 hodowlach komórkowych człowieka. Ekspresję białka wirusa stwierdzono w hodowli komórek nerki afrykańskiej małpy zielonej, nerki świni, komórek nabłonka jelit cienkich świni, nerki chomika syryjskiego (BHK-21), jajnika chomika chińskiego, pierwotnej hodowli komórek myszokoczek, hodowli fibroblastów zarodka myszy, monocytów/makrofagów myszy, wątroby i nerek szczura. W BHK-21 nie replikuje się SARS-CoV i MERS-CoV. Zakażenie linii komórkowych gryzoni przez SADS-CoV może świadczyć o wrażliwości gryzoni na zakażenie tym typem koronawirusa. Jednak po zakażeniu drogą doustną lub przez układ oddechowy u myszy (wild-type B6) nie wystąpiły objawy zapalenia przewodu pokarmowego. U myszy najważniejszym miejscem replikacji wirusa są komórki dendrytyczne w śledzionie. Być może w śledzionie myszy jest ich większa koncentracja aniżeli w jelitach bądź cechują się większą ekspresją receptora dla SADS-CoV aniżeli komórki nabłonka jelitowego. Replikacja SARS-CoV w hodowli komórkowej Vero, a nie wyłącznie w hodowlach komórek świni, świadczy o potencjalnej możliwości wirusa do poszerzenia wachlarza gospodarzy oprócz nietoperzy i świń na gryzonia. α -CoV HKU2 nietoperza *Rhinolophus* oraz SADS-CoV posiadają unikalne geny S ściśle pokrewne z beta-koronawirusem i z alfa-koronawirusem gryzoni, co świadczy o ewolucyjnych powiązaniach koronawirusa nietoperzy i gryzoni (2).

SADS-CoV replikuje się w hodowlach komórek raka wątroby, nerek zarodka człowieka, raka płuc, raka szyjki macicy i gruczolakoraka człowieka. Tak więc *in vitro* bariera pomiędzy tymi gatunkami dla SADS-CoV chyba nie jest zbyt trudna do przekroczenia. Fakt, że koronawirus SADS-CoV tak skutecznie replikuje się w 24 różnych typach komórek zwierząt, łącznie z hodowlami ludzkich komórek, wątroby, płuc i jelit, jest niepokojący. Potencjalnie więc może się on przenieść na inne gatunki zwierząt, a także na człowieka, i namnażać się w ludzkich komórkach, natomiast swinię wykorzystać jako gospodarza pośredniego (10). Dotychczas nie stwierdzano zakażeń u ludzi wywołanych przez SADS-CoV. U 35 pracowników obsługi chlewni eksponowanych na zakażenie test na obecność wirusa wypadł negatywnie.

Badanie dróg szerzenia się zakażenia SADS-CoV w Chinach wykazało, że kontakty bezpośrednie świń w hodowlach z nietoperzami są bardzo rzadkie, wręcz mało prawdopodobne. Natomiast bardzo częste i dość ściśle kontakty mają miejsce pomiędzy świnią i gryzoniami, szczególnie pomiędzy świnią i szczurami. Przypuszcza się, że nietoperze polujące na owady w sąsiedztwie ferm świń zanieczyszczają pokarm świń odchodami zanieczyszczonymi przez HKU2-like CoV i za pośrednictwem tak zanieczyszczonego wirusem pokarmu zakażają się zarówno świnią, jak gryzonia, które stają się nosicielami SADS-CoV (11). W oparciu o badanie receptora dla SADS-CoV, replikację wirusa w hodowlach tkankowych, transmisję wirusa na drodze: nietoperz \rightarrow karma \rightarrow gryzonia \rightarrow świnia oraz karma zanieczyszczona wirusem \rightarrow świnia,

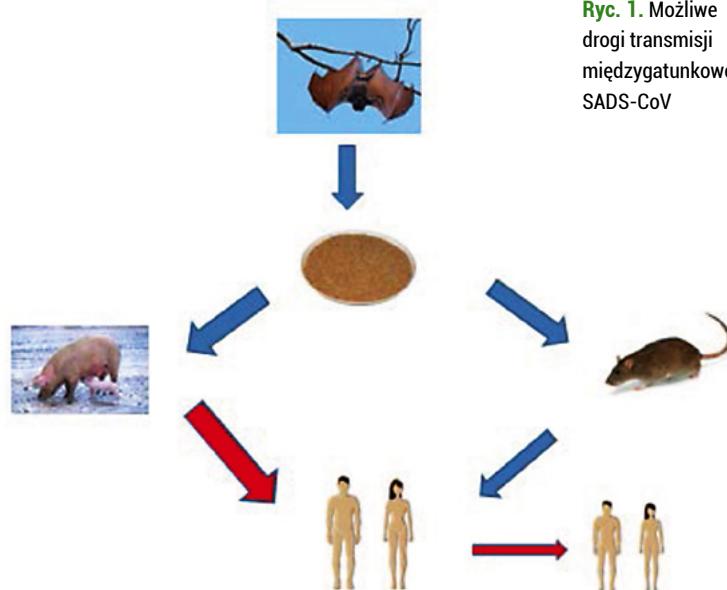
nie można całkowicie wykluczyć możliwości „przeskoczenia” przez SADS-CoV ze świni na człowieka (ryc. 1). Z tych względów są prowadzone badania nad wykrywaniem obecności wirusa w zakażonym organizmie świni i ludzi oraz nad testami do wykrywania przeciwciał i nad prewencją w populacji ludzkiej i w hodowli świń. Test RT-PCR, a zwłaszcza prosty i szybki test RT-LAMP (RT-Loop-Mediated Isothermal Amplification) stosowany do wykrywania obecności genu N pozwala na stwierdzenie nawet jednej kopii SADS-CoV/μl śliny. Cechuje się on bardzo dużą swoistością i czułością. Brak reakcji krzyżowych SADS-CoV z wirusem pomoru klasycznego świń, zespołu oddechowego świń, TGE, pryszczycy, epidemicznej biegunki prosiąt, grypy podtyp H1N1, koronawirusem prosiąt typu 2, wirusem Doliny Seneca, parwowirusem prosiąt, deltakoronawirusem prosiąt i rotawirusem (12). Potwierdzono w badaniach laboratoryjnych, że remdesivir stosowany w COVID-19 hamuje replikację SADS-CoV w hodowlach komórkowych (13).

Nadal nie jest w pełni poznana droga uwalniania SADS-CoV z zakażonej komórki i rozprzestrzeniania się w organizmie. Powszechnie uważa się, że koronawirusy wykorzystują biosyntetyczną drogę wydzielniczą do rozprzestrzeniania się w organizmie (14, 15). Pewne dane wskazują jednak, że SARS-CoV-2 używa zamiast tej ścieżki lizosomów do opuszczenia zakażonych komórek dezaktywując mechanizmy usuwania lizosomów, dzięki czemu mogą one swobodnie rozprzestrzeniać się po całym organizmie razem z wirusem. Ścieżka lizosomów jest kontrolowana Afr-like małą GTP-atepeazę Arl8b, dzięki czemu wirus jest niepodatny na inhibitory biosyntetycznej drogi wydzielniczej. Wirusy nie są niszczone w lizosomach, ponieważ pod wpływem zakażenia ulegają one odkwaszeniu i zostaje uszkodzony szlak prezentacji antygenu (16).

Walka z pandemią COVID-19 wywołaną przez beta-koronawirusa jest bardzo trudna, m.in. ze względu na brak szczepionki, jak i skutecznego leku przeciwwirusowego (wyjątek stanowi remdesivir). SADS-CoV, który jest alfa-koronawirusem, może w przyszłości okazać się równie ważną przyczyną epidemii lub pandemii ze względu na potencjał do szybkiego przenoszenia się między gatunkami, prawdopodobieństwo adaptacji do organizmu człowieka i powodowania masowych zakażeń, zwłaszcza z chwilą nabycia możliwości szerzenia się w populacji ludzkiej na drodze człowiek→człowiek (ryc. 1).

Piśmiennictwo

1. WHO: Coronavirus disease (COVID-19) outbreak. <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>
2. Pan Y., Tian X., Qin P., Wang B., Zhao P., Yang Y., Huang Y.: Discovery of a novel swine enteric alphacoronavirus (SeACoV) in southern China. *Vet. Microbiol.* 2017, **211**, 15–21.
3. Gong J., Li J., Zhou Q., Xu Z., Chen L., Zhang Y., Xue C., Wen Z., Cao Y.A.: New Bat- HKU2-like coronavirus in swine, China, 2017. *Emerg. Infect. Dis.* 2017, **23**, 1607–1609.
4. Zhou P., Fan H., Lan T., Yang X.L., Shi W.F., Zhang W., Zhu Y., Zhang Y.W., Xie Q.M., Mani S.: Fatal swine acute diarrhea syndrome caused by an HKU2-related coronavirus of bat origin. *Nature* 2018, **556**, 255–258.
5. Masters P.S.: The molecular biology of Coronaviruses. *Adv. Virus Res.* 2006, **66**, 193–292.



Ryc. 1. Możliwe drogi transmisji międzygatunkowej SADS-CoV

6. Woo P.C., Lau S.K., Tsang C.C., Lau C.C., Wong P.C., Chow F.W., Fong J.Y., Yuen K.: HKU15 in respiratory tract of pigs and first discovery of coronavirus quasi species in 5'-untranslated region. *Emerg. Microbes Infect.* 2017, **6**:e53. doi: 10.1038/emi.2017.37
7. Zhou Z., Sun Y., Yan X., Tang X., Ki Q., Tan Y., Lan T., Ma J.: Swine acute diarrhea syndrome coronavirus (SADS-CoV) antagonizes interferon- β production via blocking IPS-1 and RIG-I. *Virus Res.* 2020, **278**, 197843.
8. Li W., Moore M.J., Vasilieva N., Sui J., Wong S.K., Berne M.A., Somasundaran M., Sullivan J.L., Luzuriaga K., Greenough T.C., Choe H., Farzan M.: Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature* 2003, **426**, 450–454.
9. Raj V.S., Mou H., Smits S.L., Dekkers D.H.W., Müller M.A., Dijkman R., Muth D., Demmers J.A.A., Zaki A., Fouchier R.A.M., Thiel V., Drosten C., Rottier P.J.M., Osterhaus A.D.M.E., Bosch B.J., Haagmans B.L.: Di-peptidyl peptidase 4 is a functional receptor for the emerging human coronavirus EMC. *Nature* 2013, **495**, 251–254.
10. Yang Y.L., Qin P., Wang B., Liu Y., Xu G.H., Peng L., Zhou J., Zhu S.J., Huang Y.W.: Broad cross-species infection of cultured cells by bat HKU2-related swine acute diarrhea syndrome coronavirus and identification of its replication in murine dendritic cells in vivo highlight its potential for diverse interspecies transmission. *J. Virol.* 2022, **93**. doi: 10.1128/JVI.01448-19
11. Wang W., Lin X.D., Guo W.P., Zhou R.H., Wang M.R., Ge S., Mei S.H., Li M.H., Shi M., Holmes E.C., Zhang Y.Z.: Discovery, diversity and evolution of novel coronavirus sampled from rodents in China. *Virology* 2015, **474**, 19–27.
12. Wang H., Cong F., Zeng F., Lian Y., Liu X., Luo M., Guo P., Ma J.: Development of a real time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification method (RT-LAMP) for detection of a novel swine acute syndrome coronavirus (SADS-CoV). *J. Virol. Methods* 2018, **200**, 45–48.
13. Wang L.Y., Cui J.J., Ouyang Q.Y., Zhan Y., Guo C.X., Yin J.Y.: Remdesivir and COVID-19. *Lancet* 2020. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32019-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32019-5)
14. Robinson M., Schor S., Barouch-Bentov R., Einav S.: Viral journeys on the intracellular highways. *Cell. Mol. Life Sci.* 2018, **75**, 3693–3714.
15. Fung T.S., Liu D.X.: Post-translational modifications of coronavirus proteins: roles and functions. *Future Virol.* 2018, **13**, 405–430.
16. Ghos S., Dellibovi-Ragheb T.A., Pak E., Qiu Q., Fisher M., Takvorian P.M., Bleck C., Hsu V., Fehr A.R., Perlman S., Achar S.R., Straus M.R., Whittaker R.R., de Haan C.A.M., Altan-Bonnet G., Altan-Bonnet N.: β -Coronaviruses use lysosomal organelles for cellular egress. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2020.07.25.192310>