

Atypowy pestivirus świń – prawdopodobna przyczyna drżączki wrodzonej typu A-II u prosiąt

Małgorzata Pomorska-Mól

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

Atypical swine pestivirus – the likely cause of congenital tremor syndrome type A-II in piglets

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

This article aims at presenting new data on the etiology of congenital tremor syndrome in piglets. Until the confirmation of the presence of pestiviruses in animals such as bats or rats, it was generally accepted that pestiviruses are pathogens of hoofed animals. Historically, CSFV was considered to be the only representative of the *Pestivirus* genus pathogenic for pigs with significant clinical relevance. Discovery of the so-called atypical porcine pestivirus (APPV) and other pestiviruses, showed that the diversity within the genus *Pestivirus* is much larger than previously thought. The results obtained recently, indicate that APPV may be the causative agent of congenital tremor type A-II in piglets. The future research in this area should focus on detailed explanation of virus transmission and on measures to improve the diagnosis and control of the disease, by developing vaccines. Available data indicate that APPV is widespread and may be important for pig production worldwide. The economic significance and range of the losses associated with APPV infection is still undetermined, but the estimated calculations indicate a 10% decrease in reproduction efficiency in the affected farms.

Keywords: atypical porcine pestivirus, congenital tremors, etiology.

Pestiwirusy to zróżnicowana grupa RNA wirusów otoczkowych, z genomem o długości około 12 300 par zasad, należących do rodziny *Flaviviridae* (1). Z wymienioną rodziną wirusów najczęściej kojarzone są takie patogeny, jak wirus biegunki bydła i choroby błon śluzowych typu 1 i 2 (BVDV-1, BVDV-2), wirus choroby granicznej owiec (BDV) oraz wirus klasycznego pomoru świń (CSFV). Poza wymienionymi do pestiwirusów zakwalifikowano także szereg wirusów zidentyfikowanych w ostatnich latach (2, 3, 4, 5). Wirusy zawierające materiał genetyczny w postaci kwasu rybonukleinowego (RNA) charakteryzują się brakiem stabilności genetycznej oraz korzystają z wielu mechanizmów zmienności, co zapewnia im przetrwanie w środowisku (24). Cechy wyróżniające wirusy RNA to ogromna liczebność, produktywny cykl replikacyjny, niewielki oraz plastyczny genom podlegający nieprecyzyjnej replikacji. To sprawia, że egzystują w naturze jako wiele blisko spokrewnionych podtypów. Dynamikę ich zmienności charakteryzuje ciągłe powstawanie nowych wariantów i selekcja najlepiej przystosowanych szczepów do różnorodnych warunków środowiska (24).

Do momentu potwierdzenia obecności pestiwirusów u takich zwierząt jak nietoperze czy szczury

powszechnie akceptowany był pogląd, że jest to grupa patogenów typowa dla zwierząt kopytnych (2, 3). Zakażenia klasycznymi pestiwirusami występują na całym świecie i wywierają ogromny wpływ na ekonomię produkcji zwierzęcej. Dlatego w wielu krajach wprowadzono różnego rodzaju programy mające na celu eradykację chorób, takich jak wirusowa biegunka i choroba błon śluzowych bydła (BVD) czy klasyczny pomór świń (CSF). Historycznie CSFV był uznawany za jedyne przedstawiciela rodzaju *Pestivirus* patogenne dla świń, o istotnym znaczeniu klinicznym (11, 13).

Pierwszy z tzw. nowych pestiwirusów patogennych dla świń, wirus Bungowannah, został odkryty u świń w Australii w 2003 r., jednak nie znaleziono żadnego związku pomiędzy zakażeniem tym wirusem a występowaniem drżączki wrodzonej u prosiąt (11, 14). Udowodniono natomiast jego związek z rodzeniem się martwych płodów oraz nagłą śmiercią prosiąt noworodków (14). Wirus ten wciąż krąży w Australii, jednak do tej pory nie potwierdzono jego obecności na innych obszarach globu (11, 15). W 2017 r. pojawiło się doniesienie o kolejnym wirusie, który może być także odpowiedzialny za wystąpienie drżączki u prosiąt (20). Wirus określony mianem: lateral-shaking induced neurodegenerative agent (LINDA wirus, LV) został opisany przez naukowców z Austrii (20). Analiza genomu pozwoliła na jednoznaczne przypisanie LV do rodzaju *Pestivirus* (20). W przeciwieństwie do odkrytego w 2015 r. atypowego pestiwirusa świń (APPV), opisanego w dalszej części artykułu, który bardzo słabo namnaża się na hodowlach komórkowych, LV można łatwo namnażać na liniach komórkowych świni bez potrzeby ich adaptacji, podobnie jak to ma miejsce w przypadku wirusa Bungowannah. Naukowcy na podstawie uzyskanych dotychczas wyników wskazują, że ze względu na znaczne podobieństwo istnieje duże prawdopodobieństwo, że LV ma wspólnego przodka z wirusem Bungowannah (20).

Odkrycie tzw. atypowego pestiwirusa świń (APPV) oraz innych pestiwirusów pokazało, że zróżnicowanie w obrębie rodzaju *Pestivirus* jest dużo większe, niż dotychczas sądzono. Jest wielce prawdopodobne, że w kolejce na odkrycie czekają nowe patogeny z tego rodzaju, krążące w populacji świń domowych i dzikich czy wśród przeżuwaczy. Jak wskazują na to wyniki najnowszych badań, niedawno odkryty APPV jest zdolny do wywoływania zaburzeń neurologicznych u gospodarza, podobnie jak inne patogeny tej rodziny (np. wirus kleszczowego zapalenia mózgu, wirus Zika). Aktualne dane wskazują, że to właśnie APPV jest główną przyczyną wirusowej, wrodzonej drżączki typu A-II u świń (17).

Drżączka wrodzona u prosiąt

Drżączki wrodzone występujące u prosiąt można podzielić na dwa typy: A i B. Typ A charakteryzuje się obecnością zmian histopatologicznych w układzie nerwowym (mózg, rdzeń kręgowy), podczas gdy w drżączce typu B nie jesteśmy w stanie zidentyfikować żadnych zamian makro- i mikroskopowych w układzie nerwowym (7, 11). O ile podtypy A-I, A-III, A-IV, A-V drżączki zostały już poznane i opisane, to podtyp A-II stanowił najbardziej zagadkowy rodzaj patologii. Zakładano, że ten typ drżączki jest powodowany przez czynnik zakaźny, gdyż już ponad 40 lat temu udało się eksperymentalnie wywołać chorobę u zdrowych zwierząt, zakażając prosię lochy homogenatem z rdzenia kręgowego, mózgu i śledziony zwierząt dotkniętych tym schorzeniem (9). Ponadto większość przypadków drżączki typu A-II obserwowano u prosiąt urodzonych przez pierworódki, które stosunkowo niedawno zostały wprowadzone do stada. Brak objawów u prosiąt urodzonych przez starsze samice wskazywał na wytworzenie się u nich odporności na patogen.

Podział oraz charakterystykę poszczególnych typów oraz podtypów drżączki przedstawiono w tabeli 1.

Jak wspomniano, drżączka wrodzona prosiąt typu A-II była uznawana za chorobę zakaźną już od lat 70. ubiegłego wieku, jednak do niedawna nie udało się ustalić właściwego czynnika etiologicznego odpowiedzialnego za to zaburzenie. Przypuszczano, że czynnikiem odpowiedzialnym może być m.in. PCV2.

Atypowy pestiwirus świń został odkryty, zsekwencjonowany i po raz pierwszy opisany przez naukowców z USA w 2015 r. (5). W 2016 r. wykazano obecność APPV w różnych częściach układu nerwowego (mózg, nerwy obwodowe) prosiąt dotkniętych wrodzoną drżączką świń typu A-II, natomiast nie wykryto wirusa w tych strukturach u prosiąt klinicznie zdrowych z tej samej fermi. Wyniki tych badań skierowały uwagę naukowców na rolę APPV jako czynnika etiologicznego wrodzonej drżączki świń typu A-II (6).

Atypowy pestiwirus świń jako przyczyna drżączki prosiąt A-II

Odkad w 2015 r. zidentyfikowano i po raz pierwszy opisano APPV, sukcesywnie pojawiają się doniesienia z różnych stron świata świadczące o szerokim rozpowszechnieniu tego wirusa w populacji świń (5, 6, 8, 11, 12).

Przez długi czas jednakże nie udawało się powiązać obecności wirusa z jakimś konkretnym stanem patologicznym czy zespołem chorobowym. Obecność wirusa potwierdzano zarówno w organizmach klinicznie zdrowych świń (w surowicy), jak i u świń z objawami ze strony układu nerwowego, określanymi mianem wrodzonej drżączki prosiąt. Sukcesywnie pojawiały się nowe dane, wskazujące na to, że APPV może być przyczyną wrodzonej drżączki u prosiąt typu A-II. Opisano przypadki choroby m.in. w Stanach Zjednoczonych (6), Niemczech (8), Holandii (12), Hiszpanii (16), Austrii (11) i Chinach (21, 25). Jednak aby ostatecznie wskazać APPV jako przyczynę wrodzonej drżączki u prosiąt, wciąż pozostawały do udowodnienia 4 postulaty Kocha, choć ostatnio pojawiają się głosy o tym, że ustanowione w 1892 r. postulaty należałoby zrewidować (26). Dzisiejszy stan wiedzy wskazuje, że możliwa jest bowiem sytuacja kiedy pomimo posiadania „czystego” inokulum trudno jest wywołać zakażenie w warunkach eksperymentalnych. Niektóre warianty patogenów w obrębie populacji, w ramach tzw. quasispecies, mogą ułatwić kolonizację, służyć za immunologiczny wabik, który wprowadza w błąd układ odpornościowy, a jeszcze inna subpopulacja może ułatwić np. przekraczanie bariery krew-mózg. Drew (26) sugeruje, że ta koncepcja powinna być wzięta pod uwagę i posłużyc do modyfikacji postulatów Kocha.

Postulaty te to podstawowe reguły diagnostyczne przedstawione przez Roberta Kocha w 1892 r. Treść postulatów jest następująca:

- Postulat 1 – Drobnoustrój musi być obecny u wszystkich osobników mających daną chorobę i powinien mieć związek ze zmianami chorobowymi.
- Postulat 2 – Drobnoustrój musi być wyizolowany w czystej kulturze od osobnika chorego.
- Postulat 3 – Drobnoustrój, wyizolowany od osobnika chorego, po wprowadzeniu do organizmu zdrowego musi wywołać tę samą chorobę.
- Postulat 4 – Drobnoustrój należy ponownie wyosobnić w czystej kulturze od eksperymentalnie zakażonego człowieka lub zwierzęcia w celu spełnienia trzeciego postulatu.

Dopiero spełnienie tych postulatów jest dowodem na to, że konkretny mikroorganizm może powodować określoną chorobę.

Obecne odkrycia wskazują, że przynajmniej jedną z przyczyn wrodzonej drżączki prosiąt typu A-II jest niedawno zidentyfikowany i opisany APPV (6, 8, 10, 11).

Tabela 1. Charakterystyka, podział i przyczyny drżączki wrodzonej u prosiąt (7)

Grupa	A-I	A-II	A-III	A-IV	A-V	B
Etiologia	CSFV	Wirus: PCV2, APPV, niezany?	Genetyczna: związana z płcią, recesywna	Genetyczna: autosomalna recesywna	Trichlorfon	nieznane
Procent miotów z CT	+++	+++	+	+	+++	zmienny
Procent prosiąt z CT/miot	>40%	>80%	25%	25%	>90%	zmienny
Śmiertelność	++/+++	+	+++	+++	+++	zmienna
Płeć	M/F	M/F	M	M/F	M/F	M/F
Rasa	każda	każda	landrace	saddleback	każda	każda
Czas trwania	<4 miesiące	<4 miesiące	-	-	< miesiąc	zmienny

CT – drżączka wrodzona; + – niska(i); ++ – średnia(i); +++ – wysoka(i); M – samiec, F – samica

Ponadto w 2016 r. opublikowano pracę opisującą pierwszą izolację APPV na linii komórkowej (12), co w przyszłości może być kluczem do spełnienia wszystkich postulatów Kocha i umożliwić eksperymentalne zakażenie przeprowadzone ściśle zdefiniowanym inokulum.

Arruda i wsp. (10) w swoich badaniach wykorzystali APPV zidentyfikowanego pierwotnie w stadach, w których obserwowano przypadki drżączki typu A-II, do zakażenia ciężarnych loch (wewnątrzmacicznie, do pęcherza owodniowego). W próbkach pochodzących z opisanych stad RNA APPV wykrywano w mózgu, mózdzku, pniu mózgu, rdzeniu kręgowym i surowicy prosiąt z drżączką wrodzoną. W wyniku eksperymentalnego zakażenia u loch nie stwierdzono objawów patologicznych, wirerii i siewstwa, jednak urodzenie się prosiąt z wrodzoną drżączką typu A-II po zakażeniu do pęcherzyka owodniowego dostarczyło mocnych dowodów na to, że to APPV jest odpowiedzialny za ten rodzaj drżączki (10). Obecność wirusa potwierdzono także w różnych tkankach układu nerwowego prosiąt dotkniętych chorobą.

O związku pomiędzy obecnością APPV a występowaniem drżączki wrodzonej typu A-II piszą także w swojej pracy Postel i wsp. (6). Swoje badania naukowcy z Niemiec rozpoczęli od oceny sytuacji epidemiologicznej w zakresie APPV na terenie kraju. W tym celu przebadali dwoma różnymi testami PCR 369 próbek surowic pochodzących od klinicznie zdrowych loch oraz tuczników z południa Niemiec (20 stad, 200 próbek surowicy) oraz z północnej części kraju (9 stad, 169 próbek surowicy) (6). Oba testy potwierdziły obecność genomu APPV w surowicy 3 loch (z 2 stad z terenu Bawarii) oraz 6 tuczników z jednego stada zlokalizowanego w Dolnej Saksonii. Prewalencja na poziomie indywidualnym wyniosła 2,4% oraz ok. 10% w odniesieniu do stad. Po wykazaniu przydatności badanych testów do identyfikacji APPV naukowcy przebadali próbki pochodzące ze stad, w których obserwowano przypadki wrodzonej drżączki prosiąt typu A-II (wcześniej wykluczyli obecność innych znanych przyczyn, w tym CSFV).

Epidemiologia choroby była podobna w badanych fermach. Drżączka występowała prawie wyłącznie w miotach urodzonych przez loszki nowo wprowadzone do obiektu, z wyjątkiem jednego miotu (ogółem analizie poddano 50 miotów dotkniętych patologią). Objawy kliniczne pojawiły się po zmianie źródła, z którego pochodziły loszki remontowe. Objawy drżączki występowały u 30–40% prosiąt z dotkniętego patologią miotu. Większość z prosiąt wracała do zdrowia po 2–3 tygodniach, a całkowita śmiertelność w stadzie nie wzrosła istotnie. Wyniki potwierdziły obecność materiału genetycznego APPV w próbkach pobranych od 6 prosiąt dotkniętych wrodzoną drżączką typu A-II. Genom APPV był obecny w surowicy, płynie mózgowo-rdzeniowym, pulwanych próbkach tkanek ośrodkowego układu nerwowego (mózg, mózdzek, rdzeń kręgowy) chorych prosiąt, jednocześnie materiału genetycznego APPV nie potwierdzono w analogicznych tkankach pobranych od prosiąt z tego samego stada, ale klinicznie zdrowych. Badania te dostarczyły kolejnych przesłanek o możliwym związku pomiędzy APPV a wrodzoną drżączką typu A-II u prosiąt (6).

Potwierdzeniem wcześniej uzyskanych wyników są badania Groof i wsp. (8). Badaniami objęto 10 ferm w Holandii oraz jedną w Hiszpanii. Na fermach tych obserwowano cykliczne problemy związane z występowaniem wrodzonej drżączki prosiąt typu A-II. Problem występował głównie u loszek, choć incydentalnie dotyczył także starsze samice. W szczycie epidemii problemem dotkniętych było nawet 85% miotów urodzonych przez pierworódki. Śmiertelność wśród prosiąt (do odsadzenia) z miotów dotkniętych drżączką wynosiła ok. 26% (z czego 60% powiązано z drżączką), podczas gdy wśród miotów zdrowych 11%. Nie stwierdzono odchyień w odniesieniu do liczby prosiąt w miocie. Drżączka występowała u prosiąt obu płci, prewalencja wewnątrz miotu wahała się od poniżej 10 do 100%.

Naukowcy przebadali próbki surowicy od 99 prosiąt, u których wystąpiły objawy drżączki typu A-II (wszystkie pobrano w pierwszym tygodniu życia zwierząt), oraz od 59 prosiąt, u których nie obserwowano objawów, pobranych z ferm dotkniętych problemem drżączki. Dodatkowo przebadano próbki pobrane od 7 prosiąt w tym samym wieku z fermy, na której nigdy nie notowano podobnych problemów. W jednym ze stad analizowano siewstwo wirusa do ukończenia przez świnię wieku 8,5 miesiąca. W celu oceny dystrybucji wirusa w tkankach od wybranych prosiąt APPV-dodatnich w teście PCR pobierano: serce, jelito cienkie i grube, mózg, rdzeń kręgowy (część piersiową i krzyżową), wątrobę, węzły chłonne pachwinowe, płuca, pęcherz moczowy, pęcherzyk żółciowy, nerki, migdałki, śledzionę oraz jednojądrzaste komórki krwi obwodowej (8). Największe ilości wirusa wykrywano w migdałkach, węzłach chłonnych pachwinowych oraz w surowicy, jednak materiał genetyczny APPV potwierdzono we wszystkich pobranych tkankach. Naukowcy z Holandii wykazali obecność wielu różnych szczepów APPV u prosiąt z objawami drżączki wrodzonej (w zasadzie w każdej fermie stwierdzali odmienne szczepy), natomiast nie wykazali obecności wirusa w materiale pobranym z ferm, na których nigdy nie notowano objawów typowych dla drżączki typu A-II.

Dodatkowo aby potwierdzić przyczynowo-skutkowy charakter obecności APPV w problemowej fermie, obecnym tam wirusem zakazili eksperymentalnie 4-tygodniowe warchlaki, od których następnie pozyskano materiał do zakażenia loszek. W docelowym doświadczeniu na loszkach zakażono domięśniowo 3 loszki w 32. tygodniu ciąży. U dwóch z trzech miotów potwierdzono pionową transmisję zarazka. Obecność zarazka korelowała z pojawieniem się charakterystycznych objawów wrodzonej drżączki u zakażonych prosiąt.

Co warto podkreślić, na badanej fermie w momencie porodu generalnie nie stwierdzano wirerii u loszek, których mioty były dotknięte drżączką. Jedynie u jednej z 5 loszek wykazano niewielkie ilości wirusa w kale w czasie porodu. Wyniki te wskazują, że do zakażenia prosiąt dochodzi prawdopodobnie w okresie ciąży, a nie w czasie lub krótko po porodzie, oraz potwierdzają transplacentarną drogę zakażenia prosiąt, jako najbardziej prawdopodobną drogę transmisji zarazka (8).

Ponadto potwierdzono występowanie bezobjawowych nosicieli (dwa prosięta z zakażonych miotów). U jednego z miotów nie doszło do zakażenia płodów i nie obserwowano wystąpienia drżączki. Naukowcy spekulują, że powodem może być wcześniejszy kontakt tej loszki z wirusem APPV, który skutkował nabyciem odporności i tym samym uchronił potomstwo od zakażenia. U loszki tej stwierdzono wielokrotnie niższy poziom wirerii niż u dwóch pozostałych. Teoria ta wymaga potwierdzenia poprzez wykonanie badań serologicznych surowicy pobranej w trakcie doświadczenia od loszki, co nie zostało wykonane ze względu na ówczesny brak możliwości metodycznych (brak testów ELISA czy innych metod pozwalających na ocenę poziomu przeciwciał swoistych). Aktualnie test taki został opracowany przez naukowców z laboratorium referencyjnego ds. klasycznego pomoru świń UE i OIE w Niemczech (19).

Na podstawie długoterminowych badań na fermie, w której obserwowano incydenty drżączki wrodzonej, wykazano, że zakażenie wrodzone charakteryzuje się wysoką wirerią w okresie do ukończenia przez zwierzęta ok. 5. miesiąca życia, jednakże siewstwo wirusa z kałem obserwowane jest znacznie dłużej, co wyjaśnia długotrwałą obecność wirusa w stadzie oraz może przyczyniać się do kolejnych wybuchów choroby.

Schwarz i wsp. (11) potwierdzili obecność APPV u zwierząt z austriackich ferm dotkniętych wrodzoną drżączką typu A-II. Pierwsze zgłoszenia o chorobie lekarze opiekujący się daną fermą dostawali już w 2013 r., jednakże wtedy nie byli w stanie powiązać żadnego znanego czynnika patogennego z występującymi objawami. Wśród zgłaszanych objawów były drżączka u noworodków, wzrost śmiertelności prosiąt, spadek liczby odsadzonych prosiąt. Histologicznie wykazano charakterystyczne zmiany w centralnym układzie nerwowym (hipomielinizacja istoty białej mózdzku i rdzenia kręgowego; 11). Po opisanie w 2015 r. nowego wirusa APPV naukowcy postanowili przebadać zarchiwizowany materiał z problemowych ferm pod kątem obecności APPV i uzyskali wyniki dodatnie we wszystkich, dotąd niewyjaśnionych przypadkach wrodzonej drżączki. Wykazano 90% podobieństwa wyizolowanego w Austrii APPV z wirusem stwierdzonym na terenie USA, oraz 92% podobieństwa do izolatów niemieckich. Obecność genomu wirusa potwierdzono we wszystkich badanych płynach ustrojowych i tkankach, włączając w to tkanki ośrodkowego układu nerwowego prosiąt dotkniętych drżączką (11). Dodatkowo udało się namnożyć wirusa *in vitro* na różnych liniach komórkowych (SK-6, PK-15), jednak w stosunkowo niskim mianie. Analizując surowicę opracowaną przez siebie testem ELISA, wykazali obecność przeciwciał u loch, które urodziły zakażone mioty, oraz u zakażonych prosiąt. Obserwowali oni dosyć szybki spadek mian swoistych przeciwciał w surowicy prosiąt, które były seronegatywne już w 8. tygodniu życia. Wyniki te wskazują, że stwierdzone u prosiąt przeciwciała reprezentowały pulę przeciwciał matczynych. Ponadto potwierdzono obecność dużych ilości wirusa w surowicy, ślinie oraz nasieniu dorastających zwierząt (powyżej 12. tygodnia życia), co wskazuje na długotrwałą wirerię i siewstwo APPV. Nie udało się zidentyfikować

źródła wirusa w badanych stadach, aczkolwiek wykazano obecność dorosłych zwierząt, które są bezobjawowymi siewcami zarazka (ślina, nasienie). Sytuację komplikuje fakt braku wyraźnej serokonwersji u takich zwierząt.

Badacze sądzą, że podobnie jak to ma miejsce w przypadku innych pestiwirusów, w naturalnych warunkach może rozwinąć się immunotolerancja i wirus może przetrwać w organizmach pewnej puli zwierząt, które stają się bezobjawowymi nosicielami i siewcami patogenu. Może się tak dzieć jedynie wtedy, gdy do zakażenia wewnątrzmacicznego dochodzi w ściśle określonym czasie życia płodowego, dlatego też to zjawisko dotyczy niewielkiego odsetka prosiąt. Zwierzęta te mogą jednak stanowić rezerwuar wirusa i poważne zagrożenie dla dziewiczych stad (11). Potwierdzenie obecności materiału genetycznego APPV w nasieniu knura wskazuje także na potencjalną możliwość transmisji zarazka drogą płciową lub poprzez inseminację (11).

Na podstawie aktualnej wiedzy można stwierdzić, że w stadach, w których występuje wrodzona drżączka prosiąt typu A-II prawdopodobnie powiązana z APPV, obserwuje się kilkutygodniowe, maksymalnie kilkumiesięczne epizody wybuchu choroby, zależnie od rodzaju cyklu produkcyjnego. W okresie tym obserwuje się zarówno lochy odchowujące zdrowe prosięta, jak i mioty z objawami patologicznymi. Dane te wskazują na przejściowy charakter infekcji. Ponadto objawy kliniczne stwierdzane są jedynie u pewnego odsetka zwierząt, co wskazuje, że do zakażenia musi dojść w określonym momencie ciąży, w innym przypadku rozwijają się zakażenia podkliniczne lub przetrwałe. Patologią dotknięte są szczególnie mioty loszek nowo wprowadzonych do stada.

Sytuacja epidemiologiczna w zakresie APPV na świecie

W Holandii sytuacja w zakresie ognisk drżączki wrodzonej typu A-II była monitorowana od 2012 r. (8). Badania retrospektywne wykazały, że we wszystkich przypadkach ferm, na których notowano drżączkę prosiąt typu A-II, potwierdzono w pobranym materiale obecność APPV. Charakterystyka szczepów wykazała, dużą zmienność genetyczną szczepów (>10%) oraz obecność przynajmniej 3 odmiennych genetycznych klastarów.

Naukowcy z Hiszpanii przeprowadzili badania retrospektywne zarchiwizowanych próbek materiału biologicznego świń pochodzących z lat 1997–2016 (16). Celem badania była ocena sytuacji epidemiologicznej w zakresie APPV oraz ustalenie występowania APPV w Hiszpanii w badanych latach. W 89 z 642 analizowanych retrospektywnie próbek (13,9%) wykryto genom APPV. Miano RNA APPV było najwyższe u 1-tygodniowych prosiąt, dotkniętych drżączką typu A-II. Dane te potwierdziły, że zakażenie APPV jest epidemiologicznie powiązane z objawami drżączki wrodzonej. Analiza filogenetyczna 1615 nukleotydów NS2-3 wykazała tylko jeden określony kład APPV, grupując najbardziej filogenetycznie spokrewnione szczepy z Europy i Chin. Przeprowadzone badania pokazały,

że APPV krąży w Hiszpanii co najmniej od 1997 roku, co jest najwcześniejszą datą wykrycia tego wirusa na całym świecie i potwierdza, że APPV może być szeroko rozpowszechniony.

Badania 14,60 próbek surowicy klinicznie zdrowych świń z różnych części Europy i Azji (Niemiec, Wielkiej Brytanii, Włoch, Serbii, Szwajcarii, Chin i Tajwanu) potwierdziły, że APPV jest szeroko rozpowszechniony na świecie oraz że wirus charakteryzuje się stosunkowo dużą zmiennością (17). W powyższych badaniach analizowano zarówno obecność genomu APPV, jak i seroprewalencję. Obecność genomu APPV potwierdzono w próbkach pobranych od świń we wszystkich badanych lokalizacjach. Ogółem 130 (8,9%) z 1460 badanych próbek było pozytywnych w teście PCR. Prewalencja wahała się w zależności od kraju od 2,3% (2/86 próbek z Wielkiej Brytanii) do 17,5% (35/200 próbek z Włoch). Ponadto wykazano dosyć wysoką prewalencję APPV w Azji, wynoszącą 5% w Chinach (11/219 próbek) i 11% na Tajwanie (22/200 próbek; *ryc. 1*).

Wybrane próbki wykorzystano do oceny zmienności wirusów w obrębie gatunku. Badania pozwoliły na wygenerowanie 20 różnych sekwencji NS3 APPV z próbek pobranych od klinicznie zdrowych świń ze wszystkich krajów (sekwencje zdeponowane w GenBank pod numerami dostępu MF279213–32). Różnice genetyczne odzwierciedlają pochodzenie geograficzne jedynie w niewielkim stopniu; zmienność genetyczna nawet

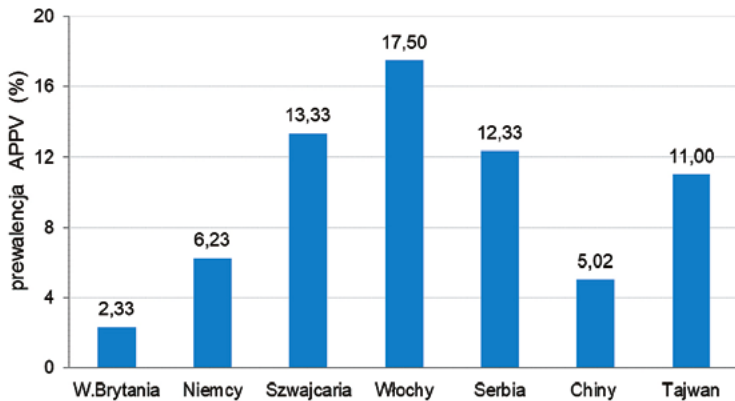
w danym kraju jest wyjątkowo wysoka (np. Niemcy i Włochy). Analizy genetyczne, w tym dane dotyczące sekwencji uzyskane z próbek chorych prosiąt, nie wykazały korelacji patogeniczności z niektórymi wariantami genetycznymi.

Dzięki zastosowaniu opracowanego przez naukowców testu ELISA możliwe było wykonanie badań serologicznych, co pozwoliło na pełniejszą ocenę sytuacji epidemiologicznej (16, 17; *ryc. 2*). W ponad 60% próbek potwierdzono obecność przeciwciał na średnim poziomie. Badania potwierdziły podobną seroprewalencję dla badanych regionów, niezależnie od częstotliwości wykrywania wirusa. Genom APPV wykrywano głównie w próbkach pochodzących od zwierząt z niskim lub średnim poziomem przeciwciał (86%). Jedynie w przypadku 14% próbek wykryto jednocześnie genom APPV, jak i wysokie miano przeciwciał. Wyniki te mogą wskazywać na wartość ochronną przeciwciał, które zabezpieczają zwierzęta przez wysoką wiramię. Spośród 40% świń, które były seronegatywne, 10% było dodatnich w teście PCR, co wskazuje na to, że próbki były pobrane od zwierząt z ostrą fazą zakażenia przed indukcją odpowiedzi humoralnej (początek infekcji) albo od zwierząt z zakażeniem przetrwałym, które może rozwinąć się u zwierząt z immunotolerancją. Zjawisko to jest dobrze znane w przypadku zakażeń wewnątrzmacicznych innymi pestiwirusami (16).

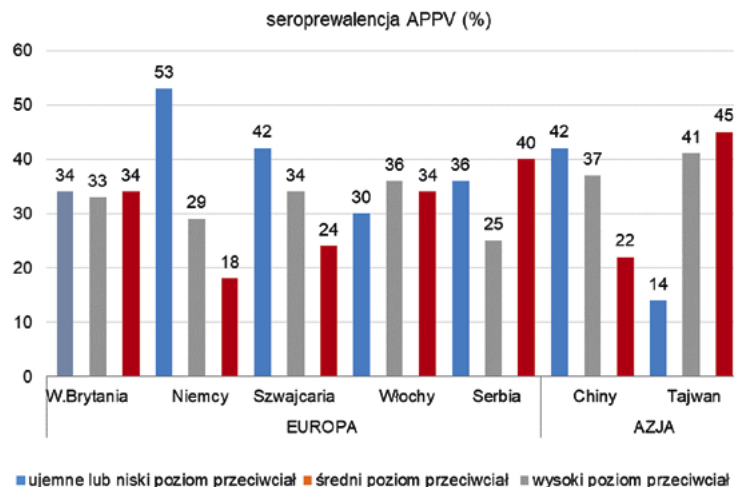
Wysoka prewalencja APPV odnotowana w populacji świń w Niemczech nie jest powiązana z występowaniem drżączki u prosiąt na tak szeroką skalę (12). Podejrzewa się, że APPV może krążyć w stadzie z wykształconą odpornością swoistą (po wcześniejszym kontakcie), nie powodując żadnych objawów klinicznych. Jest to w zgodzie z hipotezą, że klinicznie drżączka wrodzona typu A-II występuje jedynie w przypadku zakażenia dziewczyczych, ciężarnych loszek/loch w ściśle określonym momencie ciąży (10).

W 2018 r. opublikowano doniesienie potwierdzające obecność APPV w populacji świń w Brazylii (19). Jest to pierwsze doniesienie dotyczące obecności tego wirusa w Ameryce Południowej i potwierdzające szerokie rozpowszechnienie APPV na różnych kontynentach. Materiał do badań pozyskany był z dwóch ferm zlokalizowanych w południowej części kraju, w których pojawiły się przypadki drżączki u prosiąt urodzonych przez loszki (pierworódki) (19). Podobnie jak to wskazują inni badacze, nie obserwowano zaburzeń w miotach urodzonych przez starsze lochy, co potwierdza teorię o nabywaniu odporności zabezpieczającej mioty przed patologią. Analiza molekularna wykazała, że szczepy brazylijskie są blisko spokrewnione ze szczepami pochodzącymi z USA i Niemiec (19).

Także z 2018 r. pochodzi publikacja Shen i wsp. (21), w której zidentyfikowano i scharakteryzowano APPV pochodzący od prosiąt noworodków z wrodzoną drżączką z terytorium Chin. Naukowcom udało się uzyskać i poddać sekwencjonowaniu dwa szczepy. Wykazano, że podobieństwo ORF (otwartej ramki odczytu) między nimi wynosi jedynie 83,5%, co wskazuje na jeszcze większe zróżnicowanie, niż dotychczas sądzono, i potwierdza długotrwałą obecność wirusa w środowisku. Pierwszego zgłoszenia z terenu Chin dokonali Zhang i wsp. (25) w 2017 r. Potwierdzili oni obecność



Ryc. 1. Prewalencja APPV (materiał genetyczny) na podstawie badań próbek surowicy od klinicznie zdrowych świń z różnych części świata (wg 17, z modyfikacjami własnymi)



Ryc. 2. Seroprewalencja APPV na podstawie badań próbek surowicy od klinicznie zdrowych świń z różnych części świata (wg 17, z modyfikacjami własnymi)

APPV u nowo narodzonych prosiąt z dwóch różnych stad świń w prowincji Guangdong, wykazujących typowe objawy drżączki wrodzonej. W wyniku RT-PCR, sekwencjonowania i analizy filogenetycznej stwierdzono zakażenie APPV.

Obecność APPV potwierdzono także w populacji świń w Kanadzie, gdzie wirus jest także łączony z występowaniem przypadków drżączki wrodzonej u prosiąt (23).

Niedawno ukazała się praca zespołu niemieckich badaczy (22), który ocenili prevalencję oraz seroprevalencję APPV w populacji dzików z północnej części Niemiec oraz Serbii. Wyniki badania 456 próbek surowicy wykazały 19% prevalencję w odniesieniu do materiału genetycznego wirusa oraz seroprevalencję na znacznie wyższym poziomie, ok. 52%. Badania 15 próbek pochodzących od dzików z Serbii ujawniły obecność przeciwciał swoistych w 10 z nich.

Na uwagę w tym przypadku zasługuje stosunkowo wysoki odsetek dzików, u których potwierdzono obecność materiału genetycznego, w porównaniu z wynikami uzyskanymi na podstawie badania próbek od świń domowych (ok. 9%). Wskazuje to na potencjalnie istotną rolę dzików jako rezerwuaru APPV.

Podsumowując dotychczas uzyskane wyniki, ustalono, że APPV przenosi się przez łożysko i tą drogą prawdopodobnie powoduje zakażenie u nowo narodzonych prosiąt (8). Ponadto długie siewstwo wirusa z kałem oraz duże ilości wirusa w śliniankach, dwunastnicy, trzustce i okrężnicy wskazują na możliwą doustną drogę zakażenia loszek w obrębie fermy (6, 8). Dokładniejszych badań wymaga także możliwość transmisji zakażenia z nasieniem, w związku z potwierdzeniem obecności materiału genetycznego APPV w nasieniu knurów (11). Naukowcy wskazują także na zwiększoną prevalencję rozkroczności oraz innych zaburzeń postawy obserwowaną wśród miotów zakażonych APPV (6, 8, 10, 11). Objawy te wiążą się na ogół ze słabą kondycją prosiąt. Wydaje się, że APPV może być bardziej rozpowszechniony w populacji świń i powodować nie tylko drżączkę wrodzoną typu A-II, ale także inne, niewyjaśnione zaburzenia występujące u słabych prosiąt z zaburzeniami postawy i rozkrocznością. Ponadto drżączka o niewielkim nasileniu może pozostać niezauważona lub być uznawana za dreszcze spowodowane zbyt niską temperaturą.

Uzyskane dotychczas wyniki potwierdzają teorię, że to właśnie APPV może być od dawna poszukiwanym czynnikiem etiologicznym wrodzonej drżączki typu A-II u prosiąt. Wyniki te nie wykluczają jednocześnie możliwości, że także inne, niezidentyfikowane obecnie przyczyny mogą wywoływać podobny stan chorobowy, w tym opisanego niedawno LINDA wirusa. W przyszłości badania w tym obszarze powinny skoncentrować się na szczegółowym wyjaśnieniu transmisji wirusa (wewnątrz ferm, jak i zidentyfikowaniu możliwych źródeł/wektorów wirusa) oraz na działaniach zmierzających do usprawnienia diagnostyki i kontroli choroby, na przykład poprzez opracowanie szczepionek. Takie działania z sukcesem zostały wprowadzone w przypadku innych chorób powodowanych przez pestiwirusy, jak klasyczny pomór świń, wirusowa biegunka bydła czy choroba graniczna. Nie do końca wiadomo także, z czego wynika dosyć duże zróżnicowanie

objawów klinicznych w obrębie miotu (6, 8). Intensywnej pracy wymaga także stworzenie wydajnego modelu namnażania wirusa *in vitro*.

Przedstawiony w artykule przegląd dostępnego piśmiennictwa oraz dotychczasowe wyniki wskazują, że niedawno odkryty APPV występuje, prawdopodobnie długotrwale, na kilku kontynentach i że należy go uznać za patogen świń, który może mieć znaczenie dla produkcji trzody na całym świecie. Znaczenie ekonomiczne oraz wielkość strat związanych z APPV pozostają jeszcze nieokreślone, ale szacunkowe wyliczenia wskazują na spadek wydajności reprodukcji o 10% w gospodarstwie dotkniętym problemem (11).

Piśmiennictwo

1. Simmonds P.: Family Flaviviridae. W: *Virus Taxonomy. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, 1003–1020, Editors: Andrew King M.Q., Adams M.J., Carstens E.B., Leftkowitz E.J.: 2012, Elsevier Inc., San Diego, USA.
2. Firth C., Bhat M., Firth M.A., Williams S.H., Frye M.J., Simmonds P., Conte J.M., Ng J., Garcia J., Bhuvan N.P., Lee B., Che X., Quan P.-L., Lipkin W.I.: Detection of zoonotic pathogens and characterization of novel viruses carried by commensal *Rattus norvegicus* in New York City. *mBio* 2014, 5, e01933–14.
3. Wu Z., Ren X., Yang L., Hu Y., Yang J., He G., Zhang J., Dong J., Sun L., Du J., Liu L., Xue Y., Wang J., Yang F., Zhang S., Jin Q.: Virome analysis for identification of novel mammalian viruses in bat species from Chinese provinces. *J. Virol.* 2012, 86, 10999–11012.
4. Postel A., Schmeiser S., Oguzoglu T.C., Indenbirken D., Alawi M., Fischer N., Grundhoff A., Becher P.: Close relationship of ruminant pestivirus and classical Swine Fever virus. *Emerg. Infect. Dis.* 2015, 21, 668–672.
5. Hause B.M., Collin E.A., Peddireddi L., Yuan F., Chen Z., Hesse R.A., Gauger P.C., Clement T., Fang Y., Anderson G.: Discovery of a novel putative atypical porcine pestivirus in pigs in the United States. *J. Gen. Virol.* 2015, 96, 2994–2998.
6. Postel A., Hansmann F., Baechlein C., Fischer N., Alawi M., Grundhoff A., Derking S., Tenhüdnfeld J., Pfankuche V.M., Herder V., Baumgärtner W., Wendt M., Becher P.: Presence of atypical porcine pestivirus (APPV) genomes in newborn piglets correlates with congenital tremor. *Sci. Rep.* 2016, 6, 27735, 2016.
7. Done S., Williamson S., Strugnell B.W.: Chapter 19. Nervous system and locomotion. W: *Diseases of Swine 10th Ed.*, 295–328. Editor Zimmerman i wsp., John & Sons Ltd., Ames, Iowa, USA.
8. de Groof A., Deijs M., Guelen L., van Grinsven L., van Os-Galdos L., Vogels W., Derks C., Crujnsen T., Geurts V., Vrijenhoek M., Suijskens J., van Doorn P., van Leengoed L., Schrier C., van der Hoek.: Atypical porcine pestivirus: A possible cause of congenital tremor type A-II in newborn piglets. *Viruses* 2016, 8, e271.
9. Patterson D.S., Done J.T., Foulkes J.A., Sweasey D.: Neurochemistry of the spinal cord in congenital tremor of piglets (type AII), a spinal dysmyelination of infectious origin. *J. Neurochem.* 1976, 26, 481–485.
10. Arruda B.L., Arruda P.H., Magstadt D.R., Schwartz K.J., Dohlman T., Schleining J.A., Patterson A.R., Visek C.A., Victoria J.G.: Identification of a divergent lineage porcine pestivirus in nursing piglets with congenital tremors and reproduction of disease following experimental inoculation. *Plos ONE* 2016, 11, e0150104.
11. Schwarz L., Riedel C., Högl S., Sinn L.J., Voglmayr T., Wöchtl B., Dinhopf N., Rebel-Bauder B., Weissenböck H., Ladinig A., Rümnapf T., Lamp B.: Congenital infection with atypical porcine pestivirus (APPV) is associated with disease and viral persistence. *Vet. Res.* 2017, 48:1.
12. Beer M., Wernike K., Dräger C., Höper D., Pohlmann A., Bergemann C., Schröder C., Klinkhammer S., Blome S., Hoffmann B.: High prevalence of highly variable atypical porcine pestivirus found in Germany. *Transbound Emerg. Dis.* 2017, 64, e22–e26.
13. Tao J., Liao J., Wang Y., Zhang X., Wang J., Zhu G.: Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections in pigs. *Vet. Microbiol.* 2013, 165, 185–189.
14. Kirkland P.D., Frost M.J., Finlaison D.S., King K.R., Ridpath J.F., Gu X.: Identification of novel virus in pigs – Bungovannah virus: a possible new species of pestivirus. *Virus. Res.* 2007, 129, 26–34.
15. Kirkland P.D., Read A.J., Frost M.J., Finlaison D.S.: Bungovannah virus – a probable new species of pestivirus – what have we found in the last 10 years? *Anim. Health Res. Rev.* 2015, 16, 0–63.
16. Muñoz-González S., Canturri A., Pérez-Simó M., Bohórquez J.A., Rosell R., Cabezon O., Segalés J., Domingo M., Ganges L.: First report

- of the novel atypical porcine pestivirus in Spain and a retrospective study. *Transbound Emerg. Dis.* 2017, **64**, 1645–1649.
17. Postel A., Meyer D., Cagatay G.N., Feliziani F., De Mia G.M., Fischer N., Grundhoff A., Milićević V., Deng M.C., Chang C.Y., Qiu H.J., Sun Y., Wendt M., Becher P.: High abundance and genetic variability of atypical porcine pestivirus in pigs from Europe and Asia. *Emerg. Infect. Dis.* 2017, **23**, 2104–2107.
 18. Postel A., Meyer D., Petrov A., Becher P.: Recent emergence of a novel porcine pestivirus: interference with classical swine fever diagnosis? *Emerg. Microbes Infect.* 2017, **6**, e19.
 19. Mósena A.C.S., Weber M.N., da Cruz R.A.S., Cibulski S.P., da Silva M.S., Puhl D.E., Hammerschmitt M.E., Takeuti K.L., Driemeier D., de Barcellos D.E.S.N., Canal CW.: Presence of atypical porcine pestivirus (APPV) in Brazilian pigs. *Transbound Emerg. Dis.* 2018, **65**, 22–26.
 20. Lamp B., Schwarz L., Högler S., Riedel C., Sinn L., Rebel-Bauder B., Weissenböck H., Ladinig A., Rumenapf T.: Novel pestivirus species in pigs, Austria, 2015. *Emerg. Infect. Dis.* 2017, **23**, 1176–1179.
 21. Shen H., Liu X., Zhang P., Wang L., Liu Y., Zhang L., Liang P., Song C.: Identification and characterization of atypical porcine pestivirus genomes in newborn piglets with congenital tremor in China. *J. Vet. Sci.* 2018, **19**, 468–471.
 22. Cagatay G.N., Antos A., Meyer D., Maistrelli C., Keuling O., Becher P., Postel A.: Frequent infection of wild boar with atypical porcine pestivirus (APPV). *Transbound Emerg. Dis.* 2018, **65**, 1087–1093.
 23. Dessureault F.G., Choinière M., Provost C., Gagnon C.A.: First report of atypical porcine pestivirus in piglets with congenital tremor in Canada. *Can. Vet. J.* 2018, **59**, 429–432.
 24. Mirosław P., Antos A., Polak M.: Zmienność genetyczna wirusa biegunki bydła i choroby błon śluzowych. *Post. Mikrobiol.* 2017, **56**, 389–394.
 25. Zhang K., Wu K., Liu J., Ge S., Xiao Y., Shang Y., Ning Z.: Identification of atypical porcine pestivirus infection in swine herds in China. *Transbound Emerg. Dis.* 2017, **64**, 1020–1023.
 26. Drew T.W.: Emerging porcine diseases – the drivers and the dogma. Proceedings IPVS, 2018. 25th International Pig Veterinary Society Congress, 11–14 June 2018, Chongqing, China, 003–014.