
Pesta Porcină Africană: epidemiologie, diagnostic și caracterizare moleculară

REZUMAT AL TEZEI DE DOCTORAT

Doctorand Paul Andrei Ungur

Conducător de doctorat Prof.univ. dr. Cornel Cătoi



INTRODUCERE

Pesta porcină africană este o boală hemoragică virală a porcilor care s-a răspândit în toată Europa, făcând ravagii în producția de porci și economie, perturbând comerțul cu porci și produse porcine și chiar afectând bunăstarea socială în zonele afectate (BERGMANN și colab., 2021). Virusul pestei porcine africane, agentul cauzal al bolii, este un virus ADN de dimensiuni mari, complex, envelopat, care aparține familiei Asfarviridae și genului Asfivirus și este cunoscut pentru stabilitatea sa excepțională în mediu (MAZUR-PANASIUK și colab., 2019; BLOME și colab. 2020). Virusul PPA infecțios poate fi recuperat din țesuturile de porc timp de luni sau chiar ani la temperaturi scăzute, în special din țesuturile precum sânge, mușchi sau piele stocate la -20 sau 4 °C (FISCHER și colab., 2020). Boala afectează atât porcii sălbatici, cât și cei domestici, cel mai adesea cu evoluție acută. Animalele infectate prezintă hipertermie, anorexie, hiperemie cutanată, tulburări respiratorii și vasculare. Rata mortalității poate ajunge la 100% (BELLINI și colab., 2021). Montgomery a raportat prima dată boala în Kenya în 1921 (MONTGOMERY, 1921), dar boala este acum răspândită în Africa, Europa și Asia, provocând pierderi economice și zootehnice masive (SAUTER-LOUIS și colab., 2021).

În 2017, boala a fost semnalată și în România, primul caz fiind raportat la doi porci domestici din județul Satu Mare, în nord-vestul țării. Un an mai târziu, a fost semnalată în Delta Dunării, tot la porci domestici, iar apoi a fost confirmată la mistreți. Apariția virusului a fost pusă pe seama comerțului ilegal cu carne și produse din carne de porc în Satu Mare și din cauza migrației mistreților în apropierea granițelor de țară din Delta Dunării (BOKLUND și colab., 2018). Întrucât România are un consum mare de carne de porc, creșterea porcilor este o ramură importantă a agriculturii în țară, iar pierderile economice sunt resimțite atât de gospodăria, cât și de marile ferme industriale. Pentru a oferi avertismente sau consiliere agențiilor de reglementare responsabile cu protecția sănătății publice în general și a sănătății animale, în special în ceea ce privește tendințele de transmitere a bolilor în efective, epidemiologia veterinară ajută prin studierea răspândirii bolilor la animale (SALMAN, 2009). S-a considerat că factorii externi de risc al biosecurității au o influență substanțială în introducerea și răspândirea PPA în efectivele de porci domestici. Măsurile de biosecuritate sunt considerate a fi un instrument fundamental pentru prevenirea introducerii și răspândirii bolilor la populațiile de animale și s-a demonstrat că sunt așa. S-a descoperit că mulți factori de risc legați de biosecuritate au un rol crucial în răspândirea și întreținerea PPA în populațiile de porci domestici (VILTROP și colab., 2021).

STRUCTURA LUCRĂRII

În literatura de specialitate există puține date referitoare la pesta porcina africană în România.

Lucrarea intitulată „Pesta porcina africană: epidemiologie, diagnostic și caracterizare moleculară” conține 141 de pagini și este redactată conform normelor în vigoare, fiind structurată în două părți.

Prima parte, respectiv cea bibliografică, este structurată în 7 capitole și cuprinde 34 de pagini. În această parte a tezei am sintetizat cadrul general actual al cunoașterii etiologiei, epidemiologiei, patogenezei, tabloului clinic și patologic, metodelor de diagnostic dar și a prevenției și controlului pestei porcine africane.

În cea de a doua parte, extinsă pe 88 de pagini și structurată în 5 capitole, am detaliat cercetările personale realizate în perioada 2018-2022. Fiecare capitol este împărțit în subcapitole ce prezintă scopul și obiectivele, materialele și metodele utilizate, rezultatele obținute cu discuții asupra noutății acestora comparativ cu alte studii efectuate și concluziile parțiale aduse în urma efectuării fiecărui studiu în parte. Rezultatele cercetării au fost ilustrate într-un număr de 33 de figuri și sintetizate în 3 tabele. Lucrarea se încheie cu bibliografia citată (231 titluri).

REZULTATELE CERCETĂRII

În partea a doua a prezentei lucrări, am studiat aspectele clinice, patologice, moleculare și epidemiologie ale pestei porcine africane, în perioadă 2018- 2022, în exploatații din toate regiunile României. Principalele obiective pe care ni le-am propus:

- Descrierea și caracterizarea tabloului clinic și a leziunilor macroscopice întâlnite la porcii pozitivi la virusul pestei porcine africane din România;
- Descrierea microscopică a leziunilor ce apar la porcii pozitivi la virusul pestei porcine africane;
- Evaluarea și caracterizarea imunohistochimică a leziunilor ce apar la porcii infectați cu virusul pestei porcine africane;
- Evidențierea aspectelor epidemiologice întâlnite în rândul populației de porcine domestice afectate de PPA din România și posibila asociere a acestora cu noi focare de boală;
- Identificarea virusului pestei porcine africane circulant în România, prin examene moleculare și caracterizarea sa moleculară prin genotipare și analiză filogenetică.

Capitolul 9, intitulat „Evaluarea clinică și morfologică a suinelor infectate cu virusul pestei porcine africane” a avut drept scop descrierea și caracterizarea tabloului clinic și a leziunilor macroscopice întâlnite la porcii pozitivi la virusul

pestei porcine africane din România. Pentru atingerea acestui scop au fost stabilite o serie de obiective: realizarea unui studiu evaluativ a principalelor semne clinice întâlnite în 9 exploatații de suine unde a fost confirmat virusul PPA; efectuarea diagnosticului necropsic la cel puțin un individ din fiecare unitate și evaluarea macroscopică a leziunilor identificate și prezentarea tabloului anatomopatologic caracteristic fiecărui organ țintă al virusului PPA. În ciuda cunoștințelor generale despre virusul PPA, ca fiind extrem de infecțios, semnele clinice specifice PPA au lipsit (Figura 5A) la indivizii rămași în viață din 3 exploatații, iar în ferma comercială, aproximativ un sfert dintre indivizi puteau fi declarați ca fiind clinic sănătoși. Evaluarea clinică efectuată prin inspecție a revelat semne clinice ce putea fi asociate cu PPA, precum apatie, decubit lateral prelungit, detresă respiratorie, tuse, hipertermie, modificări de culoare la nivelul suprafeței cutanate, dar și avort. Examinarea post mortem a fost efectuată pe 13 indivizi sacrificați la fața locului pentru acest scop, dar doar 9 dintre aceștia prezentau modificări decelabile ochiului liber. La 7 indivizi s-au descoperit epanșamente toracice și la 2 abdominale. Un singur individ prezenta modificări de culoare la nivelul urechilor. Modificări vizibile ale aparatului respirator și cordului au fost identificate la toți cei 9 porci, în timp ce la toate cadavrele s-au observat leziuni la nivelul limfonodurilor și splinei. Hemoragiile parenchimului renal au fost vizibile la 7 indivizi, în timp ce alor vezicii urinare doar la 3 porci. Doar doi indivizi prezentau modificări vizibile ale ficatului și intestinelor, iar edemul vezicii biliare și ale leziuni hemoragice s-a observat la vezica biliară a 7 indivizi.

Capitolul 10, intitulat „Evaluarea și caracterizarea histologică a leziunilor întâlnite la porcii pozitivi la PPA” a avut drept scop principal descrierea microscopică a leziunilor ce apar la porcii pozitivi la virusul pestei porcine africane. Pentru a îndeplini acest scop, ne-am propus următoarele obiective: crearea unei baze de date cu probele tisulare provenite de la 118 porci pozitivi la PPA, recepționate de la Institutul pentru Diagnostic și Sănătate Animală (IDSA); caracterizarea morfologică a leziunilor întâlnite la nivelul limfonodurilor, pulmonilor, cordului, rinichilor, splinei, ficatului și vezicii biliare și evaluarea distribuției și a severității leziunilor specifice întâlnite în organele țintă ale virusului PPA. Leziunile microscopice ce fac parte din tabloul specific al PPA au fost identificate în marea majoritate a probelor. Hemoragiile de diferite dimensiuni au fost cele mai remarcate, organele intens afectate fiind splina cu un procent de 93.1%, rinichii 87.7% și limfonodurile cu 83.7%. Leziunile edematoase au fost întâlnite în aproape toate sistemele, dar peretele vezicii biliare a fost cel mai afectat (77.8%) urmat de pulmonii cu 69,4% și cord cu 69.2%. Leziunile necrotice, respectiv depleția limfoidă a fost cea mai frecventă la nivelul splinei (68.1%) și limfonodurilor (61.5%). Infiltratul inflamator a fost evident la nivelul rinichilor (54.3%) și a pulmonilor (52.5%). Micro trombozele vasculare au fost observate în aproape toate sistemele, dar incidența cea mai mare (57.2%) a fost la nivelul limfonodurilor și a rinichilor

(50.8%). Leziunile tipice vasculitei s-au întâlnit la 31.5% dintre rinichii examinați și la 11.9% dintre limfonoduri.

Capitolul 11, intitulat „Identificarea și caracterizarea imunohistochimică a virusului pestei porcine africane în țesuturi provenite de la porci confirmați pozitiv” a avut ca scop principal evaluarea și caracterizarea imunohistochimică a leziunilor ce apar la porcii infectați cu virusul pestei porcine africane. Pentru a îndeplini acest scop, ne-am propus următoarele obiective: crearea unei baze de date cu probele tisulare provenite de la 118 porci pozitivi la PPA, recepționate de la Institutul pentru Diagnostic și Sănătate Animală (IDSA), caracterizarea imunohistochimică la leziunilor ce apar în PPA, prin utilizarea markerilor proteici p72 din capsida virală și evaluarea calitativă și cantitativă a prezenței virusului PPA în țesuturile afectate. Proteina majoră p72 din capsida virusului PPA a fost detectată în aproape toate probele de țesut examinate. În unele cazuri, datorită autolizei, caracterizarea tipurilor de celule infectate nu a fost posibilă. Un număr moderat până la marea de celule asemănătoare macrofagelor au fost imunomarcate în majoritatea probelor de țesut examinate. La nivelul citoplasmei celulelor infectate, au fost observate trei tipuri de modele de imunocolorare au fost observate: granular, similar unor incluzii sau difuz, cu intensități variate. Imunomarcarea de tip difuz a fost atât de puternică în unele celule încât uneori mascau nucleii acestora. (Figura 24C). La nivelul câtorva celule, reacțiile de imunomarcare de tipul incluziunilor, erau atât de puternice, acoperind în întregime nucleul celular încât era foarte asemănător cu imunocolorarea nucleară (Figura 24C). Proteina capsidară majoră p72 a fost de asemenea detectată extracelular sub formă de imunocolorare granulară fină până la grosieră atât în zonele de țesut afectate de cariorexă, cât și în lumenul sistemului vascular (Figura 24D, 25A,C, 26B, D). O colorare difuză ușoară de fond a fost observată în multe dintre probele examinate. Nu a fost detectată imunocolorare în probele de țesut din loturile de control negativ.

Capitolul 12, intitulat „Influența factorilor climatici și de mediu în răspândirea Pestei Porcine Africane” a pornit cu scopul de a evidenția aspectele epidemiologice întâlnite în rândul populației de porcine domestice afectate de PPA din România și posibila asociere a acestora cu noi focare de boală. Studiul descrie corelația dintre numărul de focare și numărul de porci afectați cu caracteristicile climatice și de mediu ale zonelor de focar. Pentru a îndeplini acest scop, ne-am propus următoarele obiective: realizarea unui studiu retrospectiv al focarelor de PPA ce au evoluat în România în perioada 6 februarie 2020 – 2 martie 2021 și crearea unei baze de date și efectuarea studiilor statistice cu evidențierea corelației dintre factorii climatici (umiditatea medie anuală, temperatura în timpul primăverii, verii, toamnei și iernii), factorii de mediu (altitudinea, distanța dintre pădure, lac și râu) și apariția focarelor de PPA. S-a identificat o corelație negativă foarte slabă între longitudine și numărul de cazuri (corelația Spearman, $r_s = -0,19$, $p = 0,001$) sau numărul de focare (corelația Spearman, $r_s = -0,16$, $p = 0,006$), cu mai multe cazuri de infecție în partea de vest a României. A fost detectată o regresie liniară pozitivă între numărul de cazuri și

longitudine ($p = 0,02$, $R^2 = 0,013$), arătând o creștere a numărului de cazuri în vestul țării. A fost identificată o corelație negativă foarte slabă (corelația Spearman, $r_s = -0,13$, $p = 0,01$) între numărul de porci afectați și longitudine. umiditate între 50-60% (Figura 29A). În urma analizei statistice, s-a constatat că atât numărul de porci afectați, cât și numărul focarelor s-au dovedit a fi mai mari în localitățile cu o temperatură medie de primăvară de 10–14 °C. Numărul de porci infectați este mult mai mic ($p < 0,001$) în localitățile cu o temperatură medie de primăvară între 6 și 10 °C (Figura 29B). În timpul primăverii, a fost înregistrat un număr semnificativ mai mic de porci afectați în comparație cu celelalte sezoane (test de corelare Chi-square, $X^2 = 9403,8$, $p < 0,001$) (Figura 28B-D).

Capitolul 13, intitulat „Genotiparea sușelor virusului pestei porcine africane circulante în România” a urmărit identificarea virusului pestei porcine africane circulant în România, prin examene moleculare și caracterizarea sa moleculară prin genotipare și analiză filogenetică. Pentru realizarea acestui studiu ne-am propus următoarele obiective: crearea unei baze de date cu probele de ADN purificat recepționat de la Institutul pentru Diagnostic și Sănătate Animală; detectarea virusului PPA din probe, utilizând reacția în lanț a polimerazei (PCR) și purificarea ampliconilor în vederea secvențierii genetice, editarea secvențelor și analiza filogenetică. Prezența ADN-ului viral al PPA a fost confirmată în 105 probe testate din 31 de județe din România (Figura 32). Prezența ADN-ului viral al PPA a fost confirmată în total în 117 probe testate din 31 de județe din România (Figura 32), 105 probe au fost pozitive la gena B646L a proteinei p72 și 106 probe au fost pozitive la gena E183L a proteinei p54. Unele probe au fost pozitive la ambele gene, altele doar la câte una. Probele românești cu virusul PPA s-au grupat în genotipul II cu p72 au arătat o identitate de 100% ;iar cu p54, o identitate cuprinsă între 97-100% cu izolatele comparate de vPPA din Georgia (JX857509), Armenia (JX857508), Azerbaidjan (JX857515), Belarus (KJ627215), Rusia (JX857509), Lituania (JX857508), Liv. Polonia (KJ627218) și Ucraina (JX857521) (Figura 33). Acesta este primul raport al genotipului II PPA în toate din România din prezentul studiu. Studiul actual este primul care raportează prezența genotipului II a vPPA în România.

BIBLIOGRAFIE SELECTATĂ

1. Bellini, S.; Casadei, G.; De Lorenzi, G.; Tamba, M. A Review of Risk Factors of African Swine Fever Incursion in Pig Farming within the European Union Scenario. *Pathogens* 2021, 10, 84.
2. Bergmann, H.; Schulz, K.; Conraths, F.J.; Sauter-Louis, C. A Review of Environmental Risk Factors for African Swine Fever in European Wild Boar. *Animals* 2021, 11, 2692.
3. Blome, S., Franzke, K., & Beer, M. (2020). African swine fever – A review of current knowledge. *Virus Research*, 287, 198099. doi:10.1016/j.virusres.2020.198099, 7
4. Boklund, A.; Cay, B.; Depner, K.; Földi, Z.; Guberti, V.; Masiulis, M.; Miteva, A.; More, S.; Olsevskis, E.; Šatrán, P.; et al. Epidemiological analyses of African swine fever in the European Union (November 2017 until November 2018). *EFSA J.* 2018, 16, e05494.
5. Fischer, M.; Hühr, J.; Blome, S.; Conraths, F.J.; Probst, C. Stability of African Swine Fever Virus in Carcasses of Domestic Pigs and Wild Boar Experimentally Infected with the ASFV “Estonia 2014” Isolate. *Viruses* 2020, 12, 1118.
6. Fischer, M.; Mohnke, M.; Probst, C.; Pikalo, J.; Conraths, F.J.; Beer, M.; Blome, S. Stability of African swine fever virus on heat-treated field crops. *Transbound. Emerg. Dis.* 2020, 67, 2318–2323.
7. Mazur-Panasiuk, N., Woźniakowski, G. & Niemczuk, K. The first complete genomic sequences of African swine fever virus isolated in Poland. *Sci. Rep.* 9, 1–9 (2019).
8. Mazur-Panasiuk, N., Żmudzki, J., & Woźniakowski, G. (2019). African swine fever virus – persistence in different environmental conditions and the possibility of its indirect transmission. *Journal of Veterinary Research*, 63(3), 303-310. doi:10.2478/jvetres-2019-0058
9. Montgomery, R.E. On A Form of Swine Fever Occurring in British East Africa (Kenya Colony). *J. Comp. Pathol. Ther.* 1921, 34, 159–191
10. Salman, M. The role of veterinary epidemiology in combating infectious animal diseases on a global scale: The impact of training and outreach programs. *Prev. Vet. Med.* 2009, 92, 284–287.
11. Sauter-Louis, C.; Conraths, F.J.; Probst, C.; Blohm, U.; Schulz, K.; Sehl, J.; Fischer, M.; Forth, J.H.; Zani, L.; Depner, K.; et al. African Swine Fever in Wild Boar in Europe—A Review. *Viruses* 2021, 13, 1717.
12. Viltrop, A.; Reimus, K.; Niine, T.; Mõtus, K. Biosecurity Levels and Farm Characteristics of African Swine Fever Outbreak and Unaffected Farms in Estonia—What Can Be Learned from Them? *Animals* 2021, 12, 68