

Rozprzestrzenienie zakażeń wirusem grypy w populacji świń i dzików w Polsce

IWONA MARKOWSKA-DANIEL, ZYGMUNT PEJSAK

Zakład Chorób Świń Państwowego Instytutu Weterynaryjnego, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Markowska-Daniel I., Pejsak Z.

The sero-prevalence of influenza virus amongst pigs and wild boars in Poland

Summary

The aim of the study was to determine the prevalence of porcine and human Influenza A virus (subtypes H1N1 and H3N2) amongst pig and wild boar populations in Poland.

Antibodies to influenza viruses were detected by the haemagglutination inhibition test using 4 haemagglutination units of each virus isolate. > 1:8 and > 1:40 titres were calculated as being positive results for H1N1 and H3N2 strains respectively.

The monitoring study showed the widespread occurrence of influenza virus amongst pigs and wild boars. Antibodies specific to subtype H1N1 were detected in 35% of sera from pigs and 24.1% of sera from wild boars. A serological survey of subtype H3N2 demonstrated 29.3% and 6.8% of seropositives respectively amongst pigs and wild boars. It should be stressed that subtype H1N1 of SIV circulates at a high frequency among swine as well as wild boars in the West of Poland while H3N2 subtype circulates predominantly in the East of Poland.

Keywords: swine influenza, serology, pigs, wild boars.

Grypa świń (swine influenza – SI) jest ostrą, zakaźną i zaraźliwą chorobą, przebiegającą z wysoką gorączką, posmutnieniem, kaszlem, dusznością oraz wyciekami z oczu i nosa. Występuje ona jako enzootia, obejmując w ciągu 1-2 dni całe stado. Zachorowalność wynosi 100%, a śmiertelność jest niska i wynosi około 1-4% (10, 14, 15).

Chorobę wywołuje pneumotropowy wirus grypy świń (swine influenza virus – SIV), należący do rodziny *Orthomyxoviridae*, rodzaju *Influenzavirus* (12). Jego działanie patogenne wzmagane jest często przez inne zarazki (*Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida*) oraz złe warunki środowiskowe (zimno, wilgoć, duża dobową amplitudę temperatury) (21). Wirion SIV ma kształt kulisty lub wydłużony, nukleokapsyd posiada otoczkę złożoną od wewnątrz z białka matrycowego M, które jest głównym białkiem strukturalnym, od zewnątrz zaś z warstwy lipidowej oraz wypustek białkowych o dwu odrębnych właściwościach: hemaglutyniny (H) oraz neuraminidazy (N) (10, 13). Odmienna budowa antygenowa białka M oraz nukleoproteidów zawartych w genomie są podstawą podziału wirusów grypy na typy A, B, C (6). Hemaglutynina warunkuje właściwości hemaglutynacyjne wirusa, zaś neuraminidaza powoduje elucję wirusa z zakażonych komórek (19, 22). Białka H i N są powierzchniowymi antygenami powodującymi powstawanie w zakażonym organizmie swoistych prze-

ciwiał i stanowią podstawę podziału wirusów grypy na podtypy (2). W obrębie wirusów grypy typu A stwierdzono dotychczas 15 odmiennych antygenowo hemaglutynin (H1-15) oraz 9 neuraminidaz (N1-9) (6). W etiologii choroby największe praktyczne znaczenie mają szczepy należące do typu A, które wywołują zakażenia ludzi, koni, świń, ssaków wodnych i ptaków oraz podtypu H1N1, będące przyczyną ostrej postaci grypy u świń (1, 5, 11). Szczepy o wzorze antygenowym H3N2 prawdopodobnie nie mają większego znaczenia epizootycznego u trzody chlewnej.

Sytuacja epizootyczna krajowego stada świń w zakresie występowania zakażeń SIV nie była w Polsce dotychczas badana. Celem pracy była ocena rozprzestrzenienia się zakażeń wirusem grypy typu A (podtypami H1N1 oraz H3N2) w populacji świń w Polsce.

Biorąc pod uwagę możliwość naturalnego, bezpośredniego kontaktu świń domowych i dzikich za celowe uznano także rozpoznanie sytuacji epizootycznej w populacji dzików.

Material i metody

Surowice. Badaniom poddano 3945 surowic uzyskanych w trakcie uboju świń w zakładach mięsnych położonych na terenie 48 województw. Ubijane zwierzęta odchowywane były w gospodarstwach specjalistycznych, głównie wielkotowarowych fermach trzody chlewnej. Badaniem objęto również populację dzików, ogółem przebadano 440

prób krwi pobranej z serca dzików bezpośrednio po odstrzale, w obwodach łowieckich zlokalizowanych na terenie 42 województw.

Szczepy wirusowe. Posługiwano się szczepami o wzorach antygenowych H1N1 (szczep A/Sw/Bel/1/83, o mianie EID_{50} $10^{7,5}/ml$) oraz H3N2 (szczep A/Sw/Gent/1/84, o mianie EID_{50} $10^{6,5}/ml$), które namnażano w płynie omocznio-wym 10-dniowych zarodków kurzych SPF. Szczepy otrzymano z Uniwersytetu w Gandawie, Belgia.

Surowice referencyjne. Do kontroli odczynu wykorzystywano surowicę referencyjną dodatnią zawierającą przeciwciała anty podtypowi H1N1, o mianie hemaglutynin 512 oraz surowicę dodatnią H3N2, o mianie 2560.

Odczynniki. W celu eliminacji nieswoistych inhibitorów reakcji stosowano RDE (receptor destroying enzyme) (Sigma).

Postępowanie

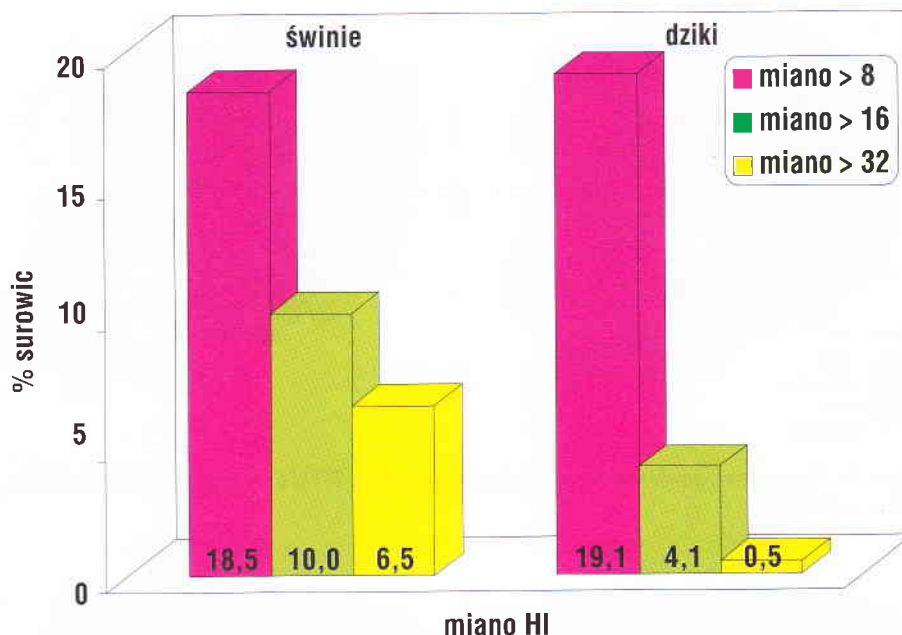
Przesłane do badań próby surowic przechowywano w temp. $-20^{\circ}C$.

Pierwszym etapem postępowania była inaktywacja surowic w temp. $56^{\circ}C$ przez 30 min. Przygotowane wstępnie surowice adsorbowano z 50% zawiesiną erytrocytów kurzych. Surowice testowane w kierunku obecności przeciwciał przeciwko podtypowi H3N2 poddawano dodatkowo reakcji eliminacji nieswoistych inhibitorów poprzez inkubację z RDE w temp. $37^{\circ}C$, przez noc.

Poziom przeciwciał swoistych dla obydwu podtypów antygenowych określano testem zahamowania hemaglutynacji (HI – haemagglutination-inhibition assay) w odmianie mikro, wg zasad podanych w Advanced laboratory techniques for influenza diagnosis (20). Z uwagi na odmienne sposoby przygotowania wstępnego surowic do badań w kierunku serokonwersji dla szczepów H1N1 i H3N2 wstępne rozcieńczenie surowic wynosiło odpowiednio 1:4 oraz 1:20. W teście HI stosowano 4 jednostki hemaglutynacyjne (4U HA) wirusa. Jako graniczne miano dodatnie przyjmowano miano antyhemaglutynin $\geq 1:8$ w przypadku badania serokonwersji dla szczepów o wzorze antygenowym H1N1 oraz $\geq 1:40$ dla szczepów H3N2.

Wyniki i omówienie

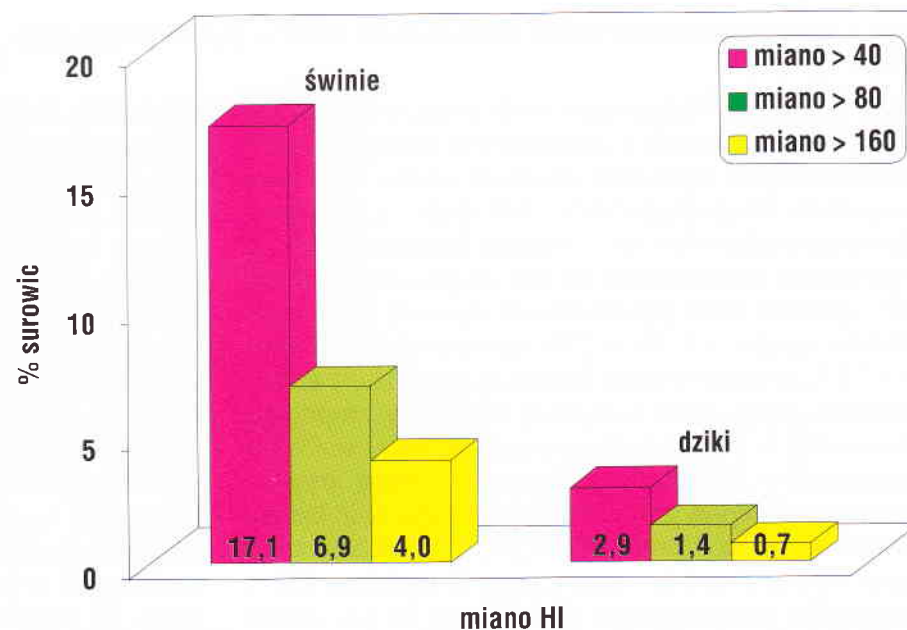
Przeprowadzone badania przeglądowe w kierunku obecności seroagentów dla SIV wskazują, że rozprzestrzenienie zakażeń tym patoge-



Ryc. 1. Występowanie przeciwciał dla wirusa grypy A podtypu H1N1 w populacji świń oraz dzików w Polsce

Tab. 1. Występowanie przeciwciał dla wirusa grypy A w krajowej populacji świń

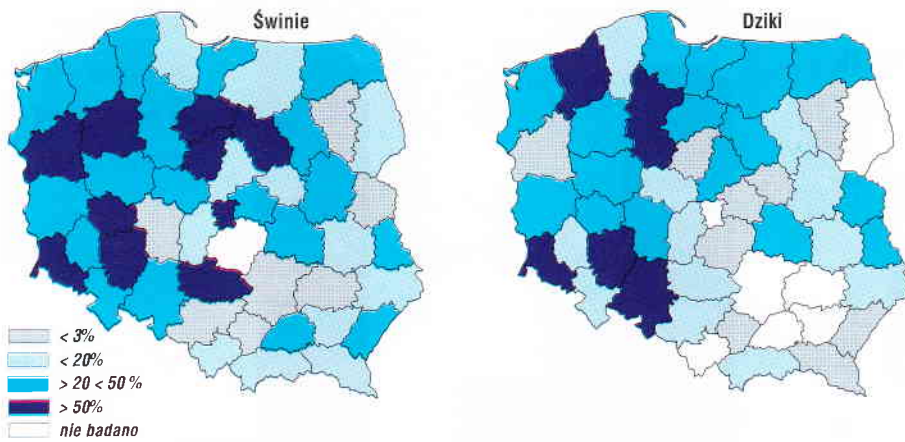
Liczba surowic	Liczba / % surowic dodatnich		
	H1N1	H3N2	H1N1 oraz H3N2
3945	1380/35,0	1158/29,3	484/12,3



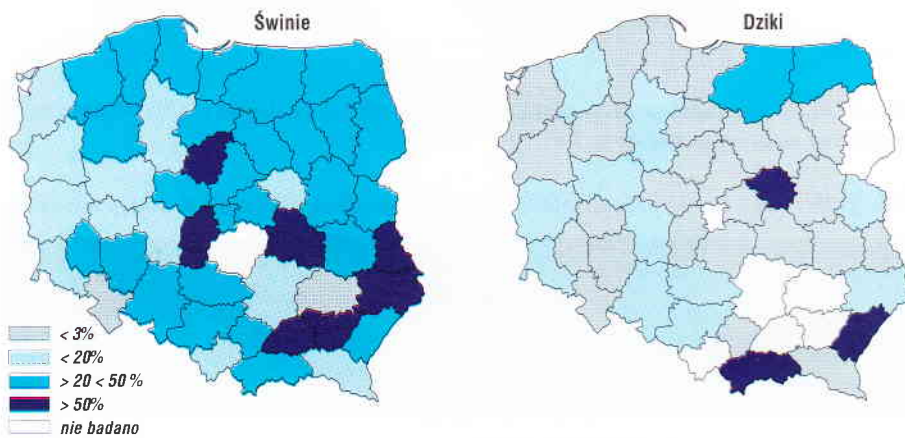
Ryc. 2. Występowanie przeciwciał dla wirusa grypy A podtypu H3N2 w populacji świń oraz dzików w Polsce

Tab. 2. Występowanie przeciwciał dla wirusa grypy A w krajowej populacji dzików

Liczba surowic	Liczba / % surowic dodatnich		
	H1N1	H3N2	H1N1 oraz H3N2
440	106/24,1	30/6,8	17/3,9



Ryc. 3. Rozprzestrzenienie wirusa grypy podtypu H1N1 w populacji świń i dzików w 1998 r.



Ryc. 4. Rozprzestrzenienie wirusa grypy podtypu H3N2 w populacji świń i dzików w 1998 r.

nem w populacji krajowego stada podstawowego jest duże. Badając świnie z gospodarstw średnio- i wielkotowarowych wykazano obecność około 35% seroreagentów dla podtypu H1N1 SIV (tab. 1). W zdecydowanej większości (ryc. 1) miano badanych surowic było niskie, kształtowało się ono na poziomie do 1:8; 395 spośród 3945 przebadanych surowic (10%) posiadało miano > 1:16, a 258 surowic (6,5%) miano > 1:32. Uzyskane wyniki świadczą o kontakcie świń z wirusem grypy, a nie o czynnej infekcji występującej u zwierząt w chwili wykonywania badań. Liczba seroreagentów dla ludzkiego szczepu wirusa grypy o wzorze antygenowym H3N2 w populacji świń kształtowała się na poziomie 1158 (29,3%). Jak wskazują na to wyniki przedstawione na ryc. 2, podobnie jak w przypadku serokonwersji dla szczepu H1N1, miano surowic było relatywnie niskie, 675 surowic (17,1%) charakteryzowało się mianem > 1:40, a miano > 1:160 posiadało jedynie 158 surowic (4%). Szczegółowa analiza wyników wykazała ponadto, że 484 surowice (12,3%) reagowały swoiście z obydwooma użytymi w badaniach antygenami, co wskazuje na możliwość występowania mieszanych infekcji wywoływanych przez różne typy antygenowe SIV.

Badania stopnia rozprzestrzenienia się zakażeń wirusem grypy typu A w populacji dzików wykazały

obecność przeciwciał swoistych dla wirusa o wzorze antygenowym H1N1 w 106 na 440 badane surowice, co stanowi 24,1% (tab. 2). Znacznie mniejsze jest zapowietrzenie populacji dzików podtypem H3N2. Serokonwersję stwierdzono w tym przypadku w 30 badanych próbach, a więc kształtowała się ona na poziomie 6,8%. Liczba surowic reagujących swoiście z obydwooma użytymi w badaniach antygenami wynosiła 17 (3,9%).

W ocenie sytuacji epizootycznej w zakresie grypy świń w kraju interesującym wydaje się fakt, że w regionie Polski zachodniej zarówno w populacji świń jak i dzików przeważa typ świński H1N1, podczas gdy w regionach wschodnich typ ludzki H3N2 (ryc. 3, 4).

Krażenie w populacji świń szczepów wirusa grypy typu A o wzorach antygenowych H1N1 czy H3N2 może stanowić zagrożenie epidemiologiczne dla człowieka (24). Badania wielu autorów wykazały, że świnie są zwierzęcym rezerwuarem wirusa grypy, mogą one stanowić bezpośrednie źródło zakażenia oraz źródło nowych wariantów antygenowych potencjalnie patogennych dla

ludzi (25). Z danych historycznych wiadomo, że pandemia grypy ludzkiej w 1918 r. wywołana była wirusem świńskim typu A (23). Również w latach 1975-76 w USA miały miejsce masowe zachorowania ludzi na „grypę świńską” (9). Z drugiej strony wiadomo, że źródłem zakażenia świń typem H3N2 wirusa grypy jest człowiek. Fakty te uzasadniają celowość monitorowania stad trzody chlewnej w celu określenia wariantów antygenowych wirusa krążących aktualnie w populacji świń. W Polsce fragmentaryczne badania z tego zakresu wykonał Karpiński i wsp. (16). Objęły one świnie ubijane w Zakładach Mięsnych w Warszawie. Interesujące wydaje się porównanie prezentowanych wyników do rezultatów badań serologicznych przeprowadzanych w krajach europejskich, azjatyckich oraz USA. W latach 1986-88 Zhang i wsp. podjęli próbę oceny sytuacji epizootologicznej w zakresie grypy świń na terenie Niemiec (26, 27). Przeprowadzona przez wymienionych autorów analiza wykazała znaczne zapowietrzenie kraju SIV. Wspomniani autorzy wykazali, że odsetek seroreagentów dla różnych szczepów wirusa grypy o wzorze antygenowym H1N1 waha się w granicach 24-32%, wyjątek w tym zakresie stanowi szczep A/Singapore/6/86, który powodował serokonwersję jedynie u 3% zwierząt. Nieco mniejsze było rozprzestrzenienie ludzkich szczepów SIV o wzo-

rze H3N2, serokonwersję wobec różnych użytych w badaniach szczepów wymienieni autorzy ocenili na poziomie 10-23%. Stwierdzili oni ponadto, że około 10% badanych zwierząt posiadało przeciwciała dla obydwu typów antygenowych wirusa grypy. Dane te wskazują, że sytuacja epizootyczna w zakresie rozprzestrzeniania się zakażeń wirusem grypy w stadach świń w Niemczech i w naszym kraju jest zbliżona. Podobne badania przeprowadzone zostały przez Browna i wsp. na terenie Wielkiej Brytanii (3, 4). Surowice z banku surowic, zgromadzone w latach 1991-92, reprezentujące populację świń w Anglii zostały scharakteryzowane serologicznie z użyciem szeregu szczepów wirusa grypy A, wyizolowanych od świń, ludzi, ptaków i koni. Okazało się, że wirus klasycznej grypy świń krąży w populacji trzody chlewnej w Anglii. Pozytywne rezultaty badań serologicznych w odniesieniu do szczepów H1N1 uzyskano w około 26% badanych surowic. Wykazano także znaczne rozprzestrzenienie się infekcji podtypem H3N2, obecność seroreagentów kształtowała się w tym przypadku na poziomie 39%. Testy serologiczne z zastosowaniem antygenów wyizolowanych od innych, wymienionych powyżej gatunków zwierząt oraz człowieka dały wynik negatywny.

Podobne badania przeprowadzone były również we Francji. Madec i wsp. zasięgiem analizy objęli stada hodowlane świń w północnej części Francji (Bretonia), gdzie znajdują się główne ośrodki hodowli trzody chlewnej (18). Wymienieni autorzy stwierdzili, że do 1981 r. populacja świń była zapowietrzona wirusem grypy w minimalnym stopniu. W kolejnym roku, w związku z importem dużej liczby zwierząt z zagranicy SIV został zawleczony do stad świń, co spowodowało gwałtowny wzrost odsetka zwierząt seropozytywnych. Liczba zapowietrzonych stad wzrosła wówczas do około 50% i od tej epizootii stan zapowietrzania kraju utrzymuje się na podobnym poziomie. Inaczej przedstawia się sytuacja w zakresie poziomu przeciwciał swoistych wobec wirusa grypy ludzkiej. Analiza prowadzona na przestrzeni lat 1982-1988 wykazała, że poziom serokonwersji wobec antygeny H3N2 jest znacznie niższy; w 1988 r. wynosił on około 6%.

Przeglądowe badania serologiczne przeprowadzone przez Chambersa i wsp., w USA, w latach 1988-89 uwiarydliły, że zakażenia podtypem H1N1 SIV notowane są głównie w rejonach o dużej gęstości populacji świń (stany środkowo-północne), a odsetek seroreagentów kształtuje się na poziomie 51% (7). Przeciwciała swoiste wobec podtypu H3N2 stwierdzono średnio u 1,1%, głównie w południowo-wschodniej części USA. Goto i wsp., na podstawie badań przeprowadzonych w latach 1985-90 w Japonii wykazali zależność wyników badań serologicznych od warunków klimatycznych związanych z sezonem, w którym pobierali materiał do badań serologicznych (8). Średnio rejestrowano w Japonii około 10-20% seroreagentów dla szczepów o wzorach antygenowych H1N1, w sezo-

nach jesienno-zimowych liczba ta wzrastała do 20-40%. Badania serologiczne z użyciem ludzkich izolatów wirusa grypy H3N2 wyizolowanych podczas epidemii grypy w Japonii w latach 1983-88 wykazały znaczne rozprzestrzenienie się infekcji tym podtypem wirusa w populacji trzody chlewnej (17). W późniejszym okresie, w latach 1989-90 odsetek seroreagentów ze wspomnianym antygenem wahał się w granicach 3-35%.

Podsumowując, należy stwierdzić, że sytuacja w zakresie występowania SIV w krajowej populacji świń zbliżona jest do obserwowanej w krajach Europy Zachodniej.

Oryginalnym osiągnięciem jest wykazanie obecności SIV w populacji dzików. Jak dotychczas nie przedstawiono w piśmiennictwie światowym żadnych danych na ten temat.

Piśmiennictwo

1. Arora D. J. S., Diaye M., Dea S.: Arch. Virol. 142, 401, 1997.
2. Brown L. E., Murray J. M., White D. O., Jackson D. C.: Arch. Virol. 114, 1, 1990.
3. Brown I. H., Manvell R. J., Alexander D. J., Chakraverty P., Hinshaw V. S.: Vet. Rec. 132, 461, 1993.
4. Brown I. H., Harris P. A., Alexander D. J.: Epidemiol. Infect. 114, 511, 1995.
5. Brown I. H., Ludwig S., Olsen C. W.: J. Gen. Virol. 78, 553, 1997.
6. Brydak L. B.: Grypa i jej profilaktyka. Springer PWN, Warszawa, 1998.
7. Chambers T. M., Hinshaw V. S., Kawaoka Y., Easterday B. C., Webster R. G.: Arch. Virol. 116, 261, 1991.
8. Goto H., Takai M., Iguchi H., Benkele W., Ohta C., Yamamoto Y., Kida H., Noro S., Sakurada N. J.: Vet. Med. Sci. 54, 235, 1992.
9. Dowdle W. R.: J. Infect. Dis. 176, 69, 1997.
10. Easterday B. C., Hinshaw V. S.: Swine influenza. W: Disease of swine, Wyd. H. W. Dunne, A. D. Leman, The Iowa State University Press, USA, 1993, s. 349.
11. Gimsa U., Grotzinger I., Gimsa J.: Virus Res. 42, 127, 1996.
12. Gourreau J. M., Kaiser C., Labie J.: Recl. Med. Vet. 163, 395, 1987.
13. Ito T., Couceiro J. N., Kelm S.: J. Virol. 72, 7367, 1998.
14. Janke B. H.: Large Anim. Pract. 19, 24, 1998.
15. Janowski H., Pejsek Z.: Choroby zakaźne układu oddechowego. Influenza świń. W: Szczegółowa patologia i terapia chorób świń, Wyd. Art. Olsztyn, 1994, s. 32.
16. Karpiński S., Seroka D., Zgorzelska K., Jackowska A., Szkudlarek L., Labuńska E.: Przegl. Epid. 40, 285, 1986.
17. Katsuda K., Sato S., Imai M., Shirahata T., Goto H.: J. Vet. Med. I Sci. 57, 773, 1995.
18. Madec F., Gourreau J. M., Kaizer C. L., Aymard M.: Mat. 11th IPVS Congress, Lausanne, Switzerland, 1990, s. 201.
19. Noble S., McGregor M. S., Wentworth D. E., Hinshaw V. S.: J. Gen. Virol. 74, 1197, 1993.
20. Palmer D. F., Coleman M. T., Dowdle W. R., Schild G. C.: Advanced laboratory techniques for influenza diagnosis. US Department of Health, Education and Welfare. Immunology series 6, 1975.
21. Pol J. M., van Leengoed L. A., Stockhofe N., Kok G., Wensvoort G.: Vet. Microbiol. 55, 259, 1997.
22. Sheerar M. G., Easterday B. C., Hinshaw V. S.: J. Gen. Virol. 70, 3297, 1989.
23. Taubenberger J. K., Reid A. H., Krafft A. E., Bijwaard K. E., Fanning T. G.: Science 275, 1793, 1997.
24. Webster R. G., Shortridge K. F., Kawaoka Y.: FEMS Immunol. Med. Microbiol. 18, 275, 1997.
25. Wentworth D. E., McGregor M. W., Macklin M. D., Neumann V., Hinshaw V. S.: J. Inf. Dis. 175, 7, 1997.
26. Zhang X. M., Schliesser T., Herbst W., Lange H.: J. Vet. Med. B 35, 474, 1988.
27. Zhang X. M., Herbst W., Lange-Herbst H., Schliesser T.: J. Vet. Med. B 36, 765, 1989.