

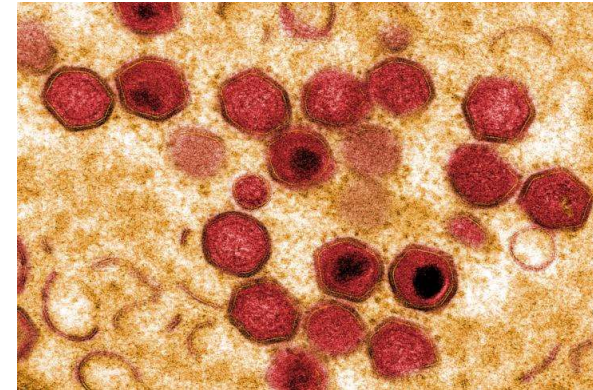
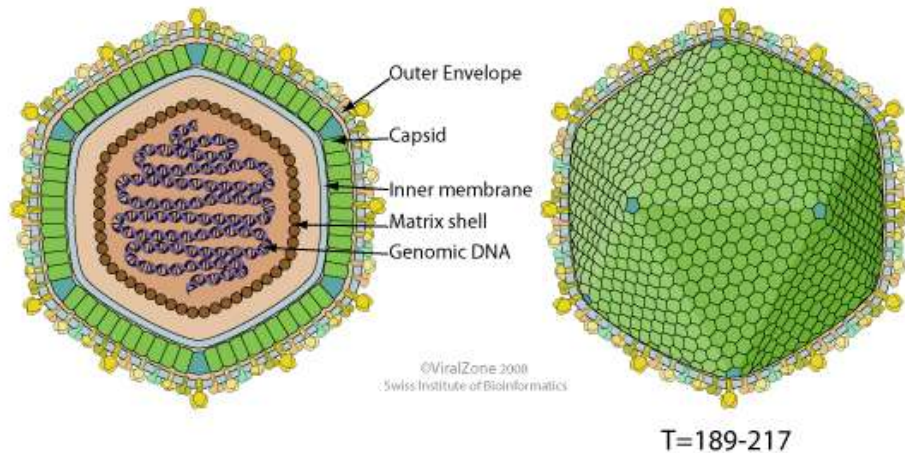
Charakteristika českých izolátů viru AMP: praktické důsledky

MVDr. Petr Václavek, Ph.D., NRL pro KMP a AMP

Odborný seminář Mze a ČZU, Liberec, 18. 1. 2023



Virus AMP



© The Pirbright Institute

- ∞ složitý obalený virus - patří mezi největší a nejkomplexnější známé viry
- ∞ není známý žádný blízce příbuzný virus
- ∞ jediný zástupce rodu *Asfivirus*, čeledi *Asfarviridae*
- ∞ genetická informace = s dvouvláknitá DNA
- ∞ jediný DNA virus, který přenášejí členovci (klíšťáky rodu *Ornithodoros*)



Evoluce viru AMP

- ∞ genom – variabilita v délce mezi izoláty: 171 - 193 000 párů bazí
- ∞ **pozoruhodně vysoká genetickou stabilita**
- ∞ přes více než desetiletou epidemickou cirkulaci kmen viru AMP získal jen velmi málo mutací, které minimálně zasáhly virové geny

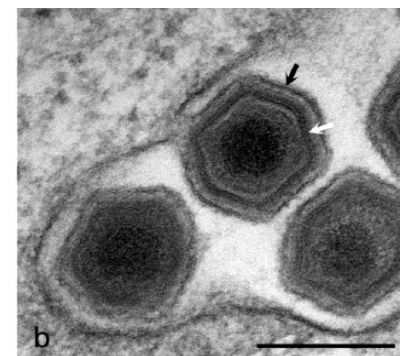
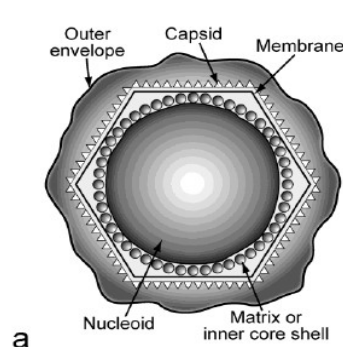
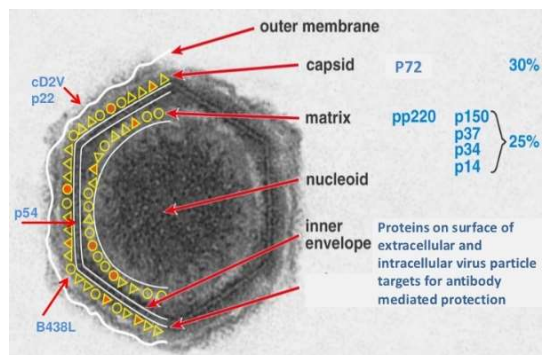
MUTAČNÍ RYCHLOST VIRU + PŘIROZENÁ SELEKCE



RYCHLOST EVOLUCE VIRU



VZNIK NOVÝCH VARIANT VIRU

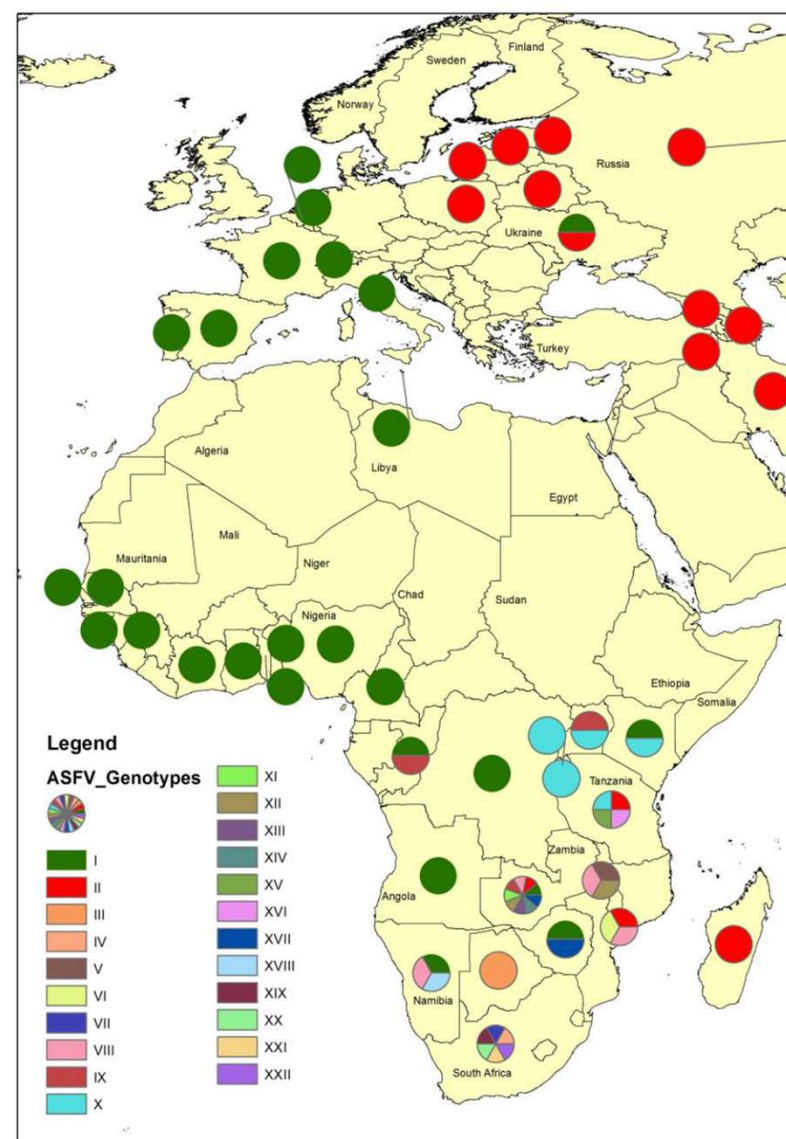


Historické geografické rozšíření genotypů AMP

v letech 1956-2015



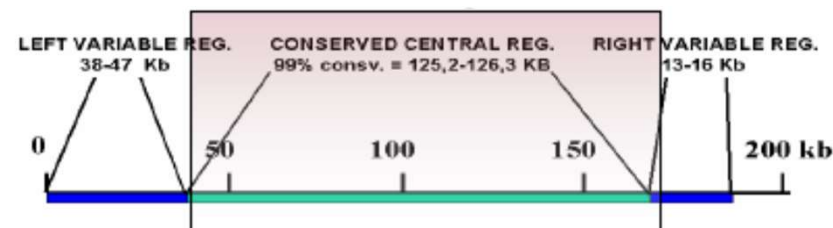
- ∞ **24 genotypů** na základě analýzy genu pro p72
- ∞ v Evropě **genotyp II.** a I. (Sardinie)
- ∞ každý genotyp AMP je charakteristický určitou virulencí, ALE v rámci jednoho genotypu mohou být různě virulentní subtypy / kmeny
- ∞ pozn. v mapě není genotyp XXIII (Etiopie) a genotyp XXIV (Mosambik)



Molekulární charakterizace izolátů AMP ze Zlínska



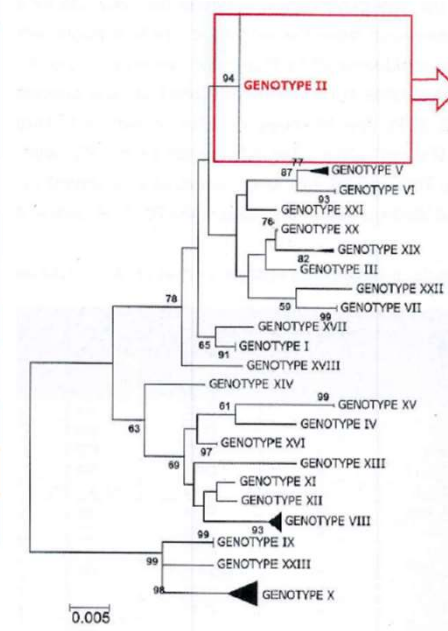
- sekvenační analýza byla provedena na cca 80 pozitivních vzorcích z ohniska na Zlínsku
- provedeno v **NRL for the AMP v SVÚ Jihlava**
- sekvenováno několik důležitých částí genomu, za účelem determinace případného nového kmene viru:
 - **B646L gen** kódující **p72 protein** = **ZÁKLADNÍ GENOTYPIZACE**
 - **central variable region - CVR of the B602L gene** = **SUBTYPIZACE**
 - **E183L gen** kódující **p54 protein** = **SUBTYPIZACE**
 - **IGR intergenic region** = **SUBTYPIZACE**
 - **CP204L gen** kódující **p30 protein** = **SUBTYPIZACE**
 - **O174L gene** = **SUBTYPIZACE**
 - **MGF (gen MGF 505)** = **SUBTYPIZACE**
 - **K145R (gen K145R)** = **SUBTYPIZACE**



Molekulární charakterizace českého izolátu viru AMP a dalších z východní Evropy (2007-2018)



ZEMĚ	ROK	P72 GENOTYP	CVR SUBTYPIZACE	IGR _{I73R-I329L} SUBTYPIZACE	MGF SUBTYPIZACE
Gruzie	2007	II	CVR1	IGR-1	MGF -1
Arménie	2007	II	CVR1	IGR-1	MGF -1
Azerbajdžán	2008	II	CVR1	IGR-1	MGF -1
Ruská federace	2007-2012	II	CVR1	IGR-1	MGF -1
	2012-2016	II	CVR1	IGR-1 + IGR-2	MGF -1 + MGF -2
Ukraina	2012, 2015	II	CVR1	IGR-2	MGF -1
Bělorusko	2013	II	CVR1	IGR -2	MGF -1
Estonsko	2014	II	CVR1	IGR-2	MGF -1
	2015-2017	II	CVR1 + CVR1SNP* + CVR 2	IGR-2	MGF -1
Lotyšsko	2014-2017	II	CVR1	IGR-2	MGF -1
Litva	2014-2017	II	CVR1	IGR-2	MGF -1
Polsko	2014-2015	II	CVR1	IGR-2	MGF -1
	2016	II	CVR1	IGR-2	MGF -1 + MGF -2
	2017	II	CVR1	IGR-1 + IGR-2	MGF -1
Moldavsko	2016	II	CVR1	IGR-2	MGF -1
Česká republika	2017	II	CVR1	IGR-2	MGF -1
Rumunsko	2017	II	CVR1	IGR-2	MGF -1



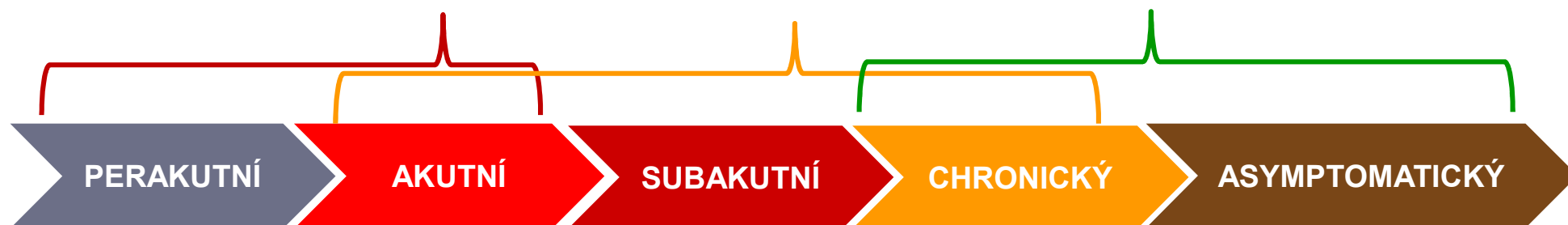
„Zlínský“ izolát

© Carmina Gallardo, CISA-INIA

SMRTNOST vs. VIRULENCE vs. PRŮBĚH

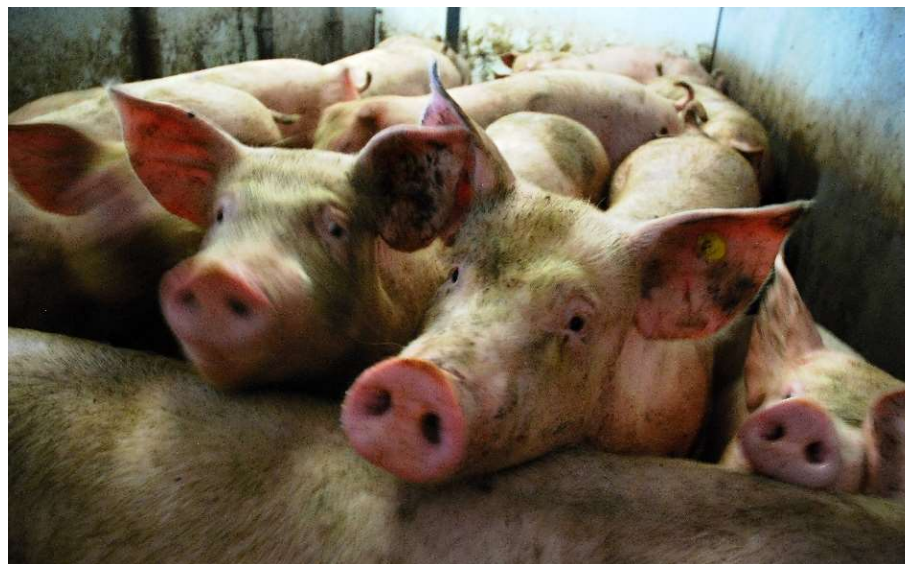


SMRTNOST: 90-100% ↔ 30-50% ↔ 2-10%
VIRULENCE: VYSOKÁ ↔ STŘEDNÍ ↔ NÍZKÁ



KLINICKÁ FORMA je součtem několika faktorů:

- ✓ virulence kmene viru
- ✓ infekční dávka
- ✓ plemeno prasete (odolnost)
- ✓ cesta infekce



Klinické příznaky AMP



PERAKUTNÍ PRŮBĚH

- ∞ **většinou náhlé úhyny s minimem patologických změn**, může být horečka (41-42°C)
- ∞ inkubační doba 1-3 dny

AKUTNÍ PRŮBĚH

- ∞ vysoká horečka (40-42°C), anorexie, letargie, slabost a uléhání
- ∞ cyanotické skvrny na kůži případně i s krváčeninami na uších, ocasu a dolních částech končetin či břicha
- ∞ dyspnoe, zvracení, průjem, v pozdějším stadiu s příměsí krve, výtok z nosních otvorů a spojivky, případně nervové příznaky, aborty
- ∞ inkubační doba 4-7 dnů (zřídka do 14 dní)
- ∞ **úhyn do 6-9 dnů u vysoce virulentních kmenů (11-16 dnů - středně virulentní)**
- ∞ smrtnost u domácích prasat 90-100%

Klinické příznaky AMP



SUBAKUTNÍ PRŮBĚH

- ∞ většinou po infekci středně virulentními kmeny
- ∞ příznaky podobné akutnímu průběhu
- ∞ **úhyn: 15-40 dnů po infekci**
- ∞ mortalita je v závislosti na věkové kategorii zvířat v rozmezí 30-70%

CHRONICKÁ FORMA

- ∞ nejméně typických příznaků
- ∞ inkubační doba 14-21 dnů
- ∞ může být zjišťována intermitentní nižší horečka, nechutenství a deprese, nekrotické změny na kůži, otoky kloubů - kulhání
- ∞ **k úhynu dochází po 2-5 měsících nebo vůbec** (mortalita < 20 %)

Patomorfologické změny u AMP

Hemorragický horečnatý stav:

- ✓ výrazná deplece lymfoidních tkání
- ✓ apoptóza lymfocytů

- ✓ narušení hemostázy
- ✓ hemoragická diatéza
- ✓ imunosuprese



! klinické příznaky a PA obraz nemusí být (a často nejsou) signifikantní pro AMP !

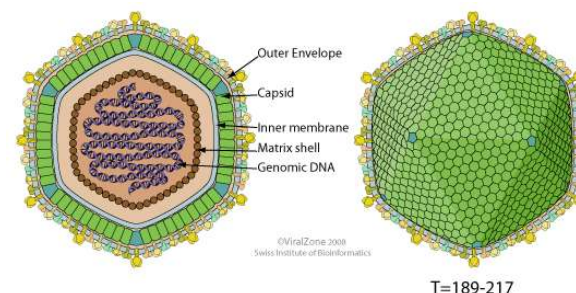


Endemicita AMP a atenuované varianty viru



Některé mutace a delece v některých genech v genomu viru AMP vedou k:

- ∞ atenuaci viru AMP
- ∞ **redukci virulence** - se zachováním kontagiozity
- ∞ non-hemadsorbing (non-HAD) izoláty
- ∞ **mírné či minimální klinické příznaky**
- ∞ **nižší mortalita a nižší smrtnost** – subakutní či chronické onemocnění
- ∞ **přeživší** – pozitivní na přítomnost protilátek



➡ komplikace VČASNÉ DIAGNOSTIKY AMP

= nové výzvy v kontrole AMP

POTŘEBA: monitoring genetické variability a evoluce viru, determinace virulence různých izolátů, další výzkum genů zodpovědných za virulenci

AMP virus - varianty na vzestupu



Emerging Microbes & Infections
2023, VOL. 12, e2146537 (13 pages)
<https://doi.org/10.1080/22221751.2022.2146537>



RESEARCH ARTICLE

OPEN ACCESS  Check for updates

African swine fever virus – variants on the rise

Jan H. Forth^{a*}, Sten Calvelage^{a*}, Melina Fischer^a, Jan Hellert^b, Julia Sehl-Ewert^c, Hanna Roszyk^a, Paul Deutschmann^a, Adam Reichold^d, Martin Lange^d, Hans-Hermann Thulke^d, Carola Sauter-Louis^e, Dirk Höper^a, Svitlana Mandyhra^f, Maryna Sapachova^f, Martin Beer^{ib}^{a†} and Sandra Blome^{a†}

^aInstitute of Diagnostic Virology, Friedrich-Loeffler-Institut, Greifswald, Germany; ^bCentre for Structural System Biology (CSSB), Leibniz-Institut für Virologie, Hamburg, Germany; ^cDepartment of Experimental Animal Facilities and Biorisk Management, Friedrich-Loeffler-Institut, Greifswald, Germany; ^dDepartment of Ecological Modelling, Helmholtz Centre for Environmental Research, Leipzig, Germany; ^eInstitute of Epidemiology, Friedrich-Loeffler-Institut, Greifswald, Germany; ^fState Scientific and Research Institute of Laboratory Diagnostics and Veterinary and Sanitary Expertise (SSRILDVSE), Kiev, Ukraine



- ∞ virus AMP se nečekaně rozdělil do **pěti jasně rozlišitelných linií s nejméně deseti různými variantami**
- ∞ **varianty jsou charakterizovány mutacemi s vysokým dopadem, které nebyly dosud identifikovány**
- ∞ **všechny nové varianty sdílejí mutaci v genu DNA polymerázy X (PolX O174L) = kauzativní role jako možného mutátorového genu = zvýšená míra mutací a tím k vyšší evoluční rychlosti, která vyvrcholila vznikem virových variant**

Varianty a linie viru AMP v Německu



Lineage I - Reference - LR899193.1



I.1

Accumulation of 13 mutations compared to ASFV Georgia 2007/1 (FR682468.2)

Lineage II - gene A240L truncation (insertion - Pos. 49.192)



II.1



II.2

+ intergenic region (point mutation - Pos. 129.982)

Lineage III - MGF360-10L truncation (nonsense - Pos. 27.197) MGF505-4R truncation (deletion - Pos. 37.027) MGF100-3L truncation (deletion - Pos. 181.407)



III.1



III.2

+ gene NP868R (missense - Pos. 136.845)

Lineage IV - MGF 360-15R truncation (nonsense - Pos. 50.922)



IV.1



IV.2

+ MGF360-15R truncation (deletion - Pos. 50.906)
+ gene D339L (missense - Pos. 140.696)



IV.3

+ MGF360-15R truncation (deletion - Pos. 50.906)
+ gene D339L (missense - Pos. 140.696)
+ gene K196R (synonymous - Pos. 65.259)



IV.4

+ MGF110-14L (synonymous - Pos. 13.809)

Lineage V - gene E199L (missense - Pos. 167.068)



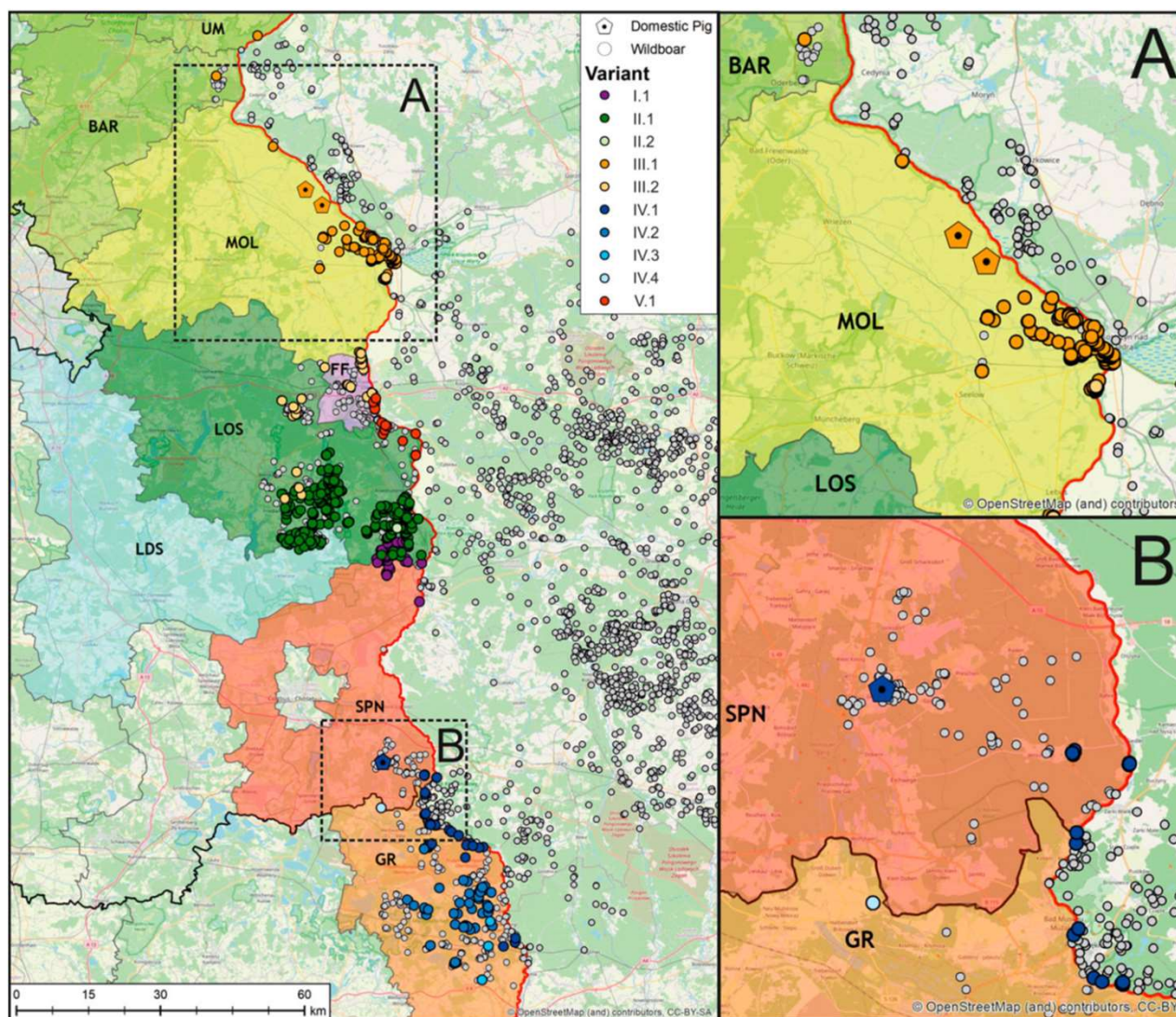
V.1

- ∞ **5 linií viru AMP** (linie sdílí alespoň jednu společnou mutaci)
- ∞ **10 variant** s jedinečnými mutacemi nebo kombinacemi mutací
- ∞ celkem 13 nových mutací (5 s nízkým dopadem a 8 s vysokým dopadem)

Varianta IV. potvrzena rovněž v ČR

Geografické rozšíření virových variant v Sasku a Braniborsku podél polské hranice

(10. 9. 2020 - 12.8. 2021)



Zemské okresy:

- **BAR** – okres Barnim
- **MOL** - Markisch-Oderland (Marecké Poodří)
- **LOS** - Oder-Spree (Odra-Spréva)
- **SPN** – Spree-Neise (Spréva-Nisa)
- **GR** – Görlitz (Zhořelec)



Praktické využití identifikace variantů a linií viru AMP v Německu

- ∞ nově identifikované mutace byly použity jako **genetické markery pro genomovou epidemiologii** pro různé kmeny ohnisek AMP v Německu
- ∞ umožnilo to ukázat **geografickou distribuci kmenů**
- ∞ umožnilo to **sledovat šíření různých AMP variant** v Německu
- ∞ pomocí této techniky byli navíc schopni přímo spojit kmeny AMP odpovědné za tři propuknutí nákazy u domácích prasat s kmeny cirkulujícími v populaci divokých prasat ve stejné oblasti

Molekulární charakterizace izolátů AMP z Frýdlantského výběžku v NRL pro AMP (SVÚ Jihlava)



- ∞ potvrzení výsledků z FLI
- ∞ **100% shoda s polským izolátem AMP** na základě porovnání genomu (kmen z blízkosti našich hranic)
- ∞ **sekvenace 7 genů:**
 - ✓ B646L gen (p72 protein)
 - ✓ CVR (B602L gen)
 - ✓ IGR (I73R-I329L)
 - ✓ E183L gen (p54 protein)
 - ✓ O174L gen
 - ✓ MGF (gen MGF 505)
 - ✓ K145R (gen K145R)





Molekulární charakterizace izolátů AMP z Frýdlantského výběžku v EURL for ASF

(Centro de Investigación en Sanidad Animal, CISA-INIA /CSIC, Madrid, Španělsko)

Genetická charakterizace analýzou šesti oblastí genomu viru AMP zařadila izolát viru z prosince 2022 z ČR do variant CVR-I, IGR-II, O174L-II, K145R-II, MGF1, ECO2-I, které odpovídají **genotypu II, cluster 6** společně s viry z Německa a Polska (z údajů dostupných v EURL a Genbank)



Skupiny založené na variantách identifikovaných v těchto variabilních oblastech genomu AMP: CVR, IGR_{I73R/I329L} (IGR), O174L, K145R, IGR_{MGF5059R/10R} (MGF) a IGR_{I329L-I215L} (ECO2)

Genetická skupina	Geografická distribuce (roky)	Genetické varianty					
		CVR	IGR	O174L	K145R	MGF	ECO2
1	Gruzie (2007), Arménie (2007, 2008), Azerbajdžán (2008), RF (2009, 2012)	I	I	I	I	I	I
2	Ruská federace (2012)	I	I	I	I	II	I
3	Ukrajina (2012-2019), Bělorusko (2013), Litva (2014-2020), Polsko (2014, 2018), Lotyšsko (2014-2021), Estonsko (2014-2022), Česká republika (2017, 2018) , Rumunsko (2017-2021), Moldavsko (2017-2018), Maďarsko (2018-2019), Slovensko (2019), Itálie (2022)	I	II	I	I	I	I
4	Ruská federace (2012).	I	I	I	I	III	I
5	Estonsko (2015)	II	II	I	I	I	I
6	Polsko (2016, 2019), Německo (2020, 2021) a Česká republika (2022)	I	II	II	II	I	I
7	Polsko (2016-2019), Litva (2017-2022), Rumunsko (2019)	I	II	I	II	I	I
8	Polsko (2016, 2017)	I	II	I	II	II	I
9	Estonsko (2017)	I-SNP1	II	I	I	I	I
10	Polsko (2017)	I	I	II	II	I	I
11	Polsko (2017)	I-SNP2	II	I	II	I	I
12	Lotyšsko (2017, 2018, 2021)	I	II	I	I	II	I
13	Poland (2017)	I	III	II	II	I	I
14	Litva (2017)	I-SNP3	II	I	I	I	I
15	Litva(2017)	I	II	I	I	V	I
16	Litva (2017, 2018)	I	II	I	I	IV	I
17	Lotyšsko (2017, 2018)	I	II	I	I	I-V1	I
18	Polsko (2018)	I	III	II	I	I	I
19	Rumunsko (2018, 2021), Bulharsko (2018-2020), Srbsko (2019, 2020), Řecko (2020), Severní Makedonie (2022)	I	II	I	I	I	II
20	Polsko (2018, 2019)	I	IV	I	II	I	I
21	Rumunsko (2019)	I	II	II	I	I	I
22	Rumunsko (2019)	I	II	II	I	I	II
23	Litva (2020)	I	II	I	I	VII	I
24	Rumunsko (2021)	I	II	I	I	VI	I

Studium patologie AMP u uhynulých divokých prasat přirozeně infikovaných německými variantami viru



Article

Pathology of African Swine Fever in Wild Boar Carcasses Naturally Infected with German Virus Variants

Julia Sehl-Ewert ^{1,*}, Paul Deutschmann ² , Angele Breithaupt ¹ and Sandra Blome ²

FRIEDRICH-LOEFFLER-INSTITUT
FLI
Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
Federal Research Institute for Animal Health

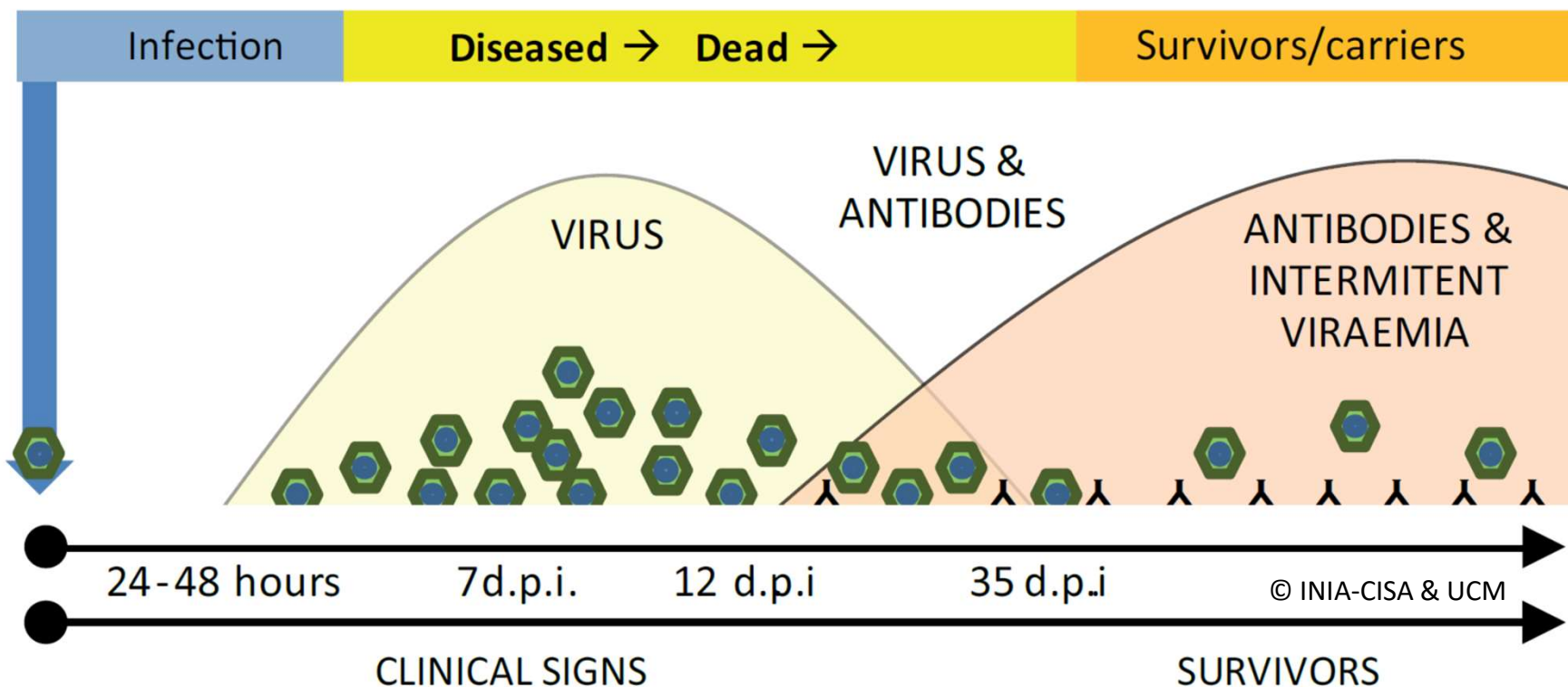


- ∞ Friedrich-Loeffler-Institut, Greifswald, Německo
- ∞ PA studie 16 uhynulých prasat ze Saska a Braniborska
- ∞ patologie, histologie, imunohistochemie, PCR a IPMA test
- ∞ vyhodnocení rozdílů nálezů ve vztahu k různým variantám viru AMP

Dynamika infekce AMP: virémie a sérokonverze



Virus AMP a specifické protilátky v krvi ve vztahu ke stádiu infekce



PERAKUTNÍ FORMA: 100% smrtnost

AKUTNÍ FORMA: 90-100% smrtnost

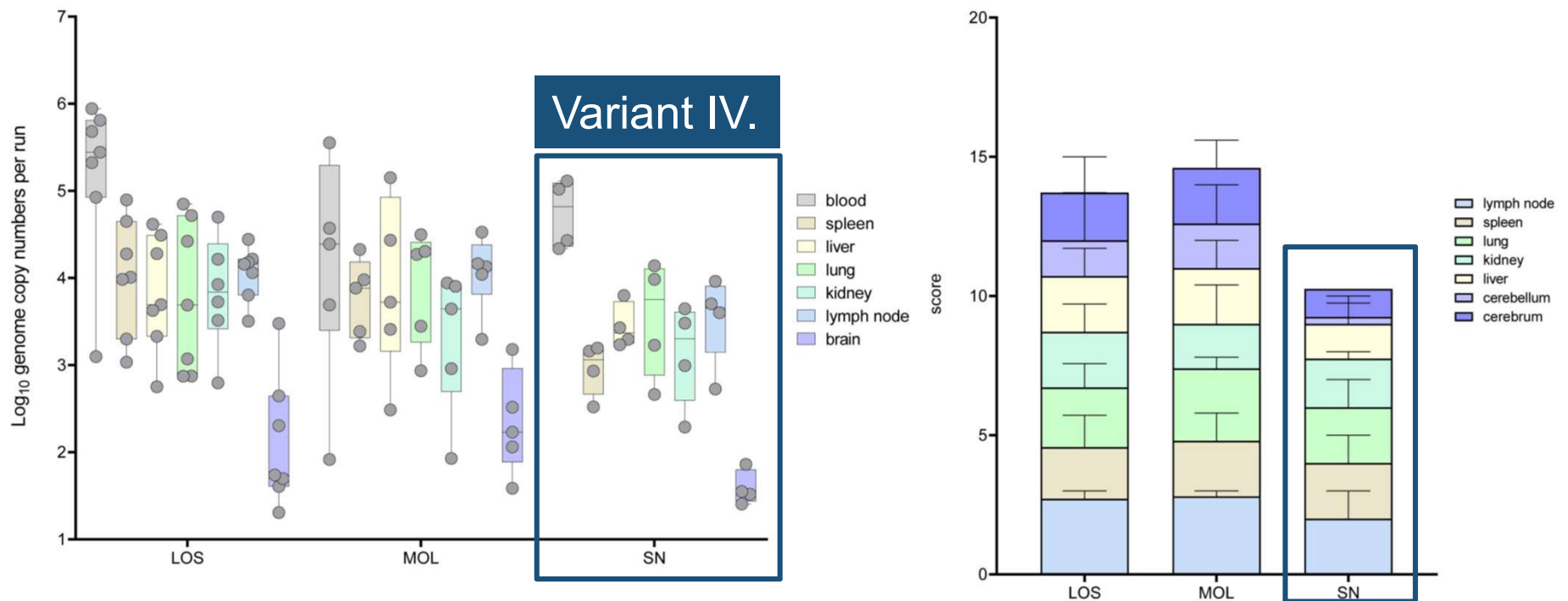
SUBAKUTNÍ FORMA: 30-70% smrtnost

CHRONICKÁ FORMA < 20 % smrtnost

Množství viru v krvi a tkáních u různých variant viru v Německu



Virová nálož (kopie genomu) ve vzorcích krve a orgánů a skládaný sloupcový diagram zobrazující množství virového antigenu v orgánech.



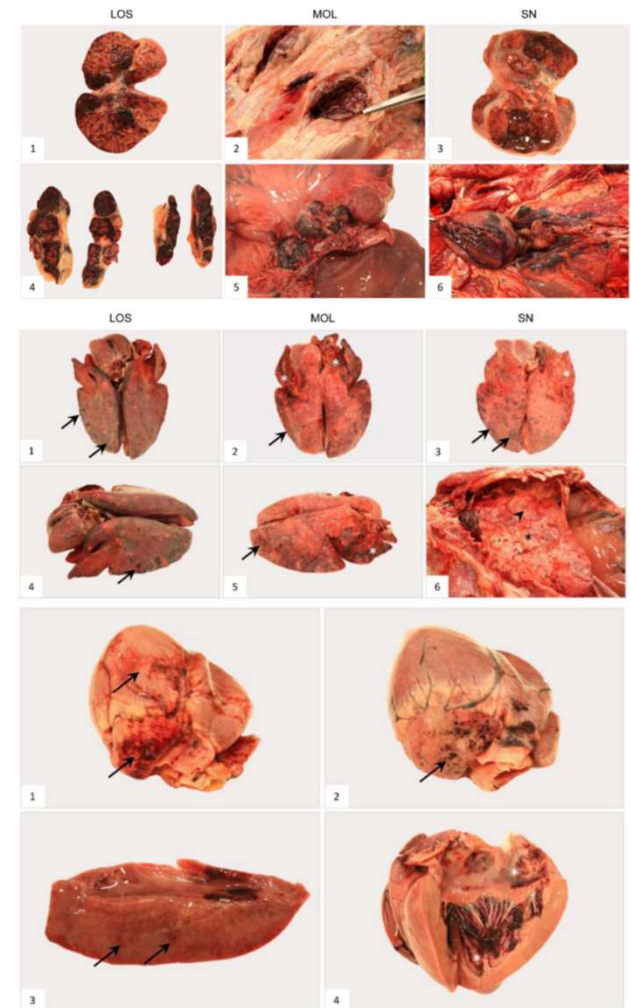
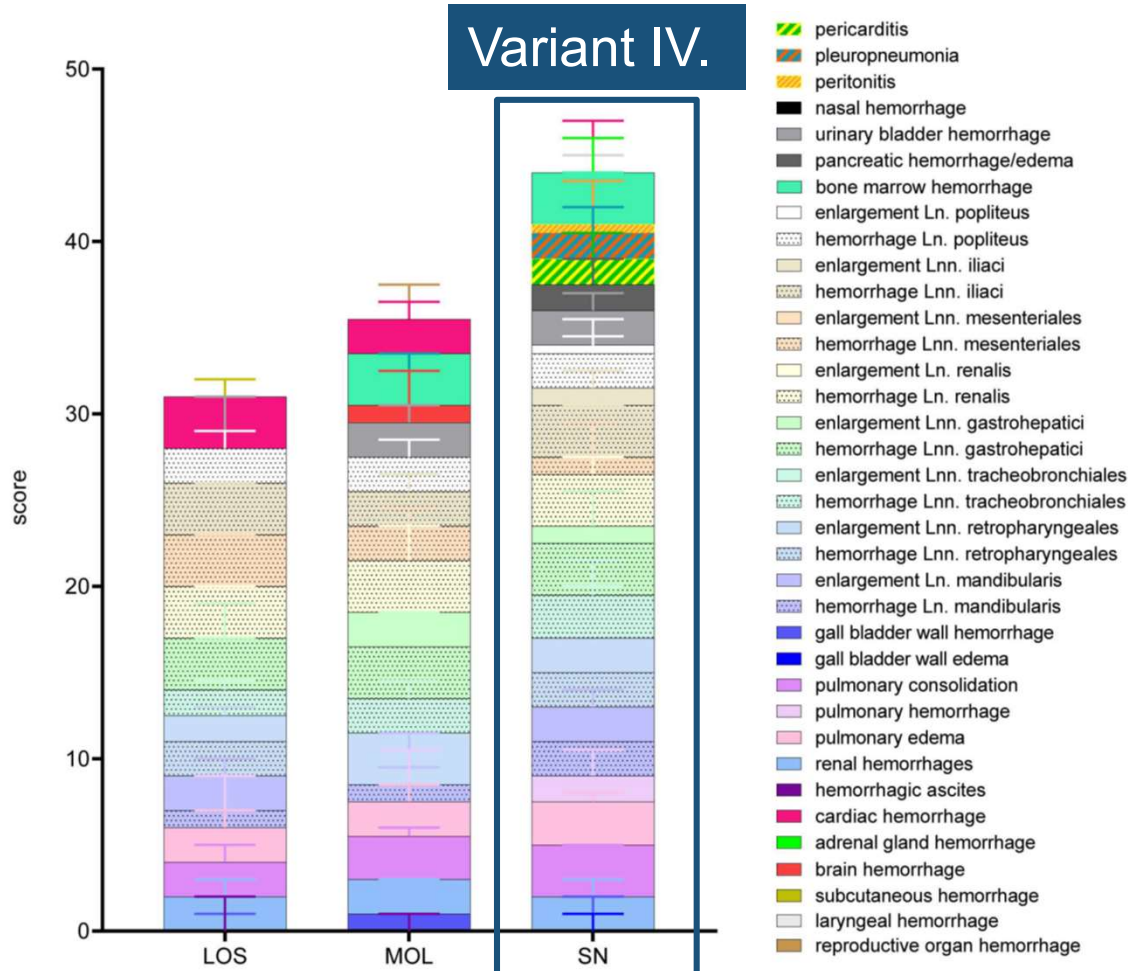
© Julia Sehl-Ewert et al. 2022, *Pathogens* 2022, 11, 1386. <https://doi.org/10.3390/pathogens11111386>

Výsledky makroskopického patologicko-anatomického vyšetření kadaverů prasat divokých

(hodnocení - bodování - celkové skóre lézí)



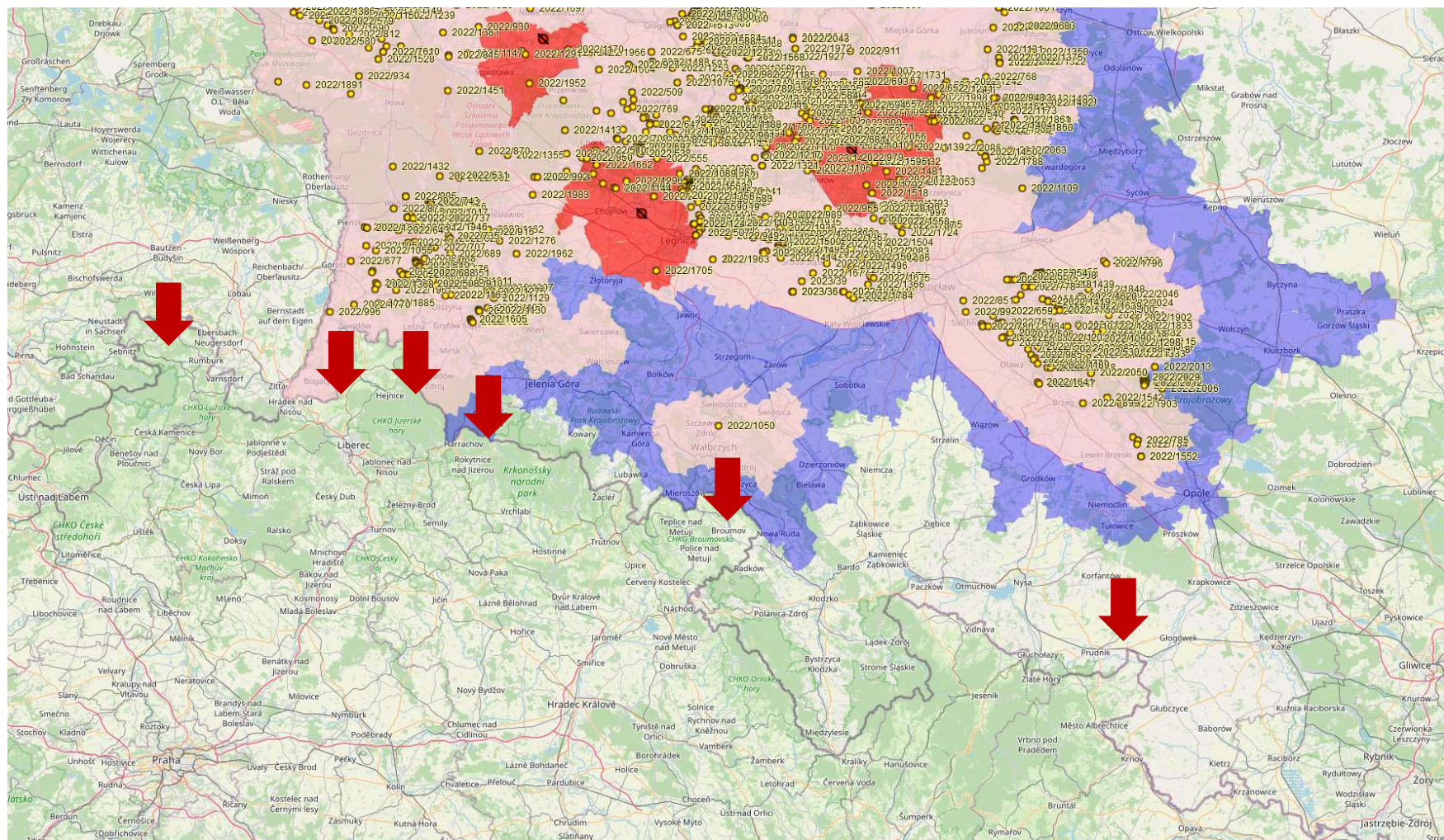
výrazné, ale ne signifikantní rozdíly



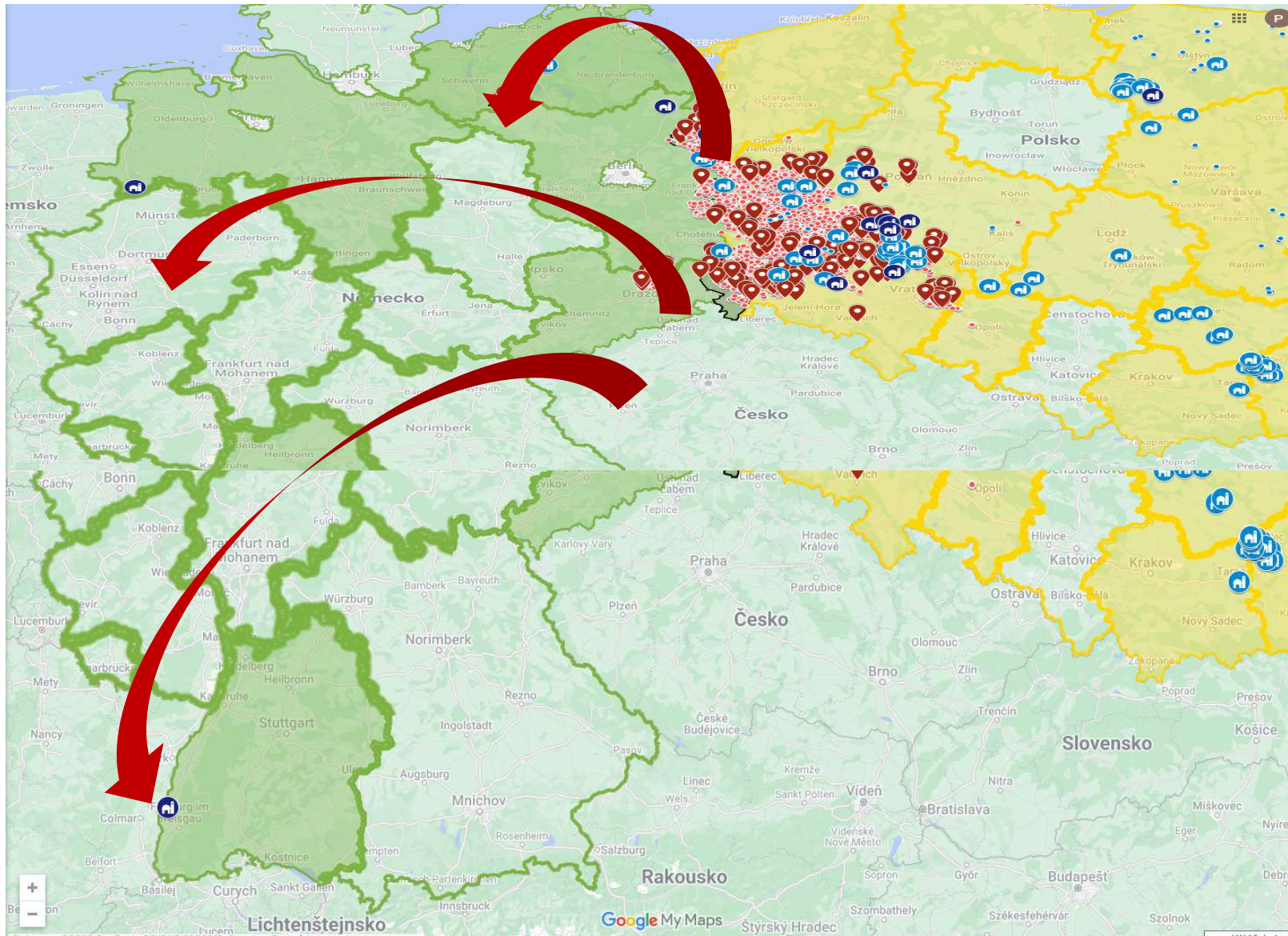


Virulence varianty IV. z okresu Spréva-Nisa na základě PA nálezu u uhynulých divokých prasat

- ∞ virologická a patomorfologická data naznačují **rozdíly ve virulenci variant**
- ∞ varianta IV. vykazovala **nižší virovou nálož** a **menší množství virových antigenů**
- ∞ **tendence k více chronickým lézím** (např. zvýšená hemoragická složka)
- ∞ **spíše protrahovaný / vleklejší** (ale přesto smrtelný) **průběh onemocnění = letální subakutní průběh** (může ovlivnit šíření nákazy)
- ∞ **letalita je i u nových variant stále velmi vysoká**
- ∞ **nutné potvrzení za standardizovaných experimentálních podmínek**



Nelze zcela vyloučit potenciál lidského faktoru



ZÁVĚR I.

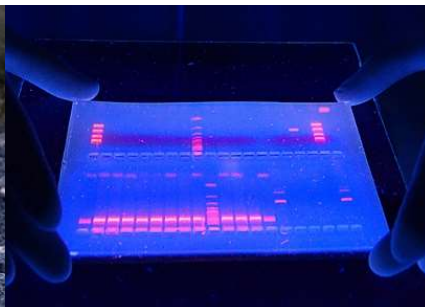


- ∞ molekulárně biologickým vyšetřením sekvenační analýzou bylo potvrzeno, že v České republice se nachází kmen viru AMP:
 - ✓ **p72 genotyp II**
 - ✓ **CVR-I, IGR-II, O174L-II, K145R-II, MGF1, ECO2-I**, které odpovídají **genotypu II, cluster 6** (= Německo a Polsko) dle „taxonomie“ EURL
 - ✓ dle německé charakteristiky se jedná o **linii IV. AMP** – variant pravděpodobně IV.1 nebo IV.2
 - ✓ probíhá další podrobnější sekvenační analýza (NGS, hemadsorbce apod.)
- ∞ **virus prokázaný u 3 případů AMP v ČR ve Frýdlantském výběžku je 100% shodný s virem AMP vyskytujícím se v blízkosti českých hranic v Německu i v Polsku**

ZÁVĚR II.



- ∞ **variant IV. viru AMP prokazuje spíše protrahovaný / vleklejší (ale přesto smrtelný) průběh onemocnění**
- ∞ **subakutní průběh onemocnění může ovlivnit šíření onemocnění**
- ∞ **linie III a IV se zdají být evolučně nejúspěšnější**
- ∞ **nutný další výzkum - probíhají experimentální infekce v BSL3 laboratořích FLI (Německo)**
- ∞ **je potřeba průběžně sledovat genetickou variabilitu, evoluci a virulenci viru AMP v různých státech nebo regionech**



Děkuji za pozornost!



Státní veterinární ústav Jihlava
State Veterinary Institute Jihlava

Rantiřovská 93/20 | 586 05 Jihlava | ČR

T: 567 143 111 | E: info@svujihlava.cz | www.svujihlava.cz