

Celem badań jest opracowanie efektywnej metody wykrywania i typowania wirusa grypy A (Influenza A virus - IAV) w fermach świń. Pozwoli to na łatwiejsze badania w zakresie epidemiologii i zmienności genetycznej tego wirusa. Wirus grypy odgrywa u świń ważną rolę zarówno jako pierwotny, jak i wtórny czynnik zakaźny układu oddechowego. Badania będą dotyczyły mniej poznanego aspektu grypy, to jest zakażeń enzootycznych, które przebiegają ze słabo wyrażonymi objawami klinicznym lub wręcz bezobjawowo. Zakażenia subklinicznie w stadach świń, niekiedy przy udziale kilku podtypów IAV, stwarzają ryzyko pojawienia się nowych wariantów wirusa o trudnych do przewidzenia właściwościach. Ponieważ monitoring z wykorzystaniem badania wymazów z nosa z ferm zakażonych subklinicznie jest problematyczny ze względu na trudności z klinicznym rozpoznaniem choroby, bardzo słabo wyrażone objawy oraz krótkotrwałe siewstwo, w swoich badaniach proponujemy ocenę możliwości zastosowania badań płynu ustnego testem real time RT-PCR do wykrywania i typowania wirusów grypy z polskich ferm świń. Cele prowadzonych badań to ocena przydatności badania płynu ustnego świń w diagnostyce i typowaniu wirusów grypy, ocena profili krążenia wirusa w różnego typu fermach, a także ocena zmienności genetycznej IAV u świń w Polsce. W projekcie planowana jest realizacja czterech dużych zadań badawczych. W zadaniu 1 zostaną uzyskane wymazy z nosa i płyn ustny od zwierząt z kilku ferm zakażonych IAV. Próbkę będą zbadane w real time PCR do wykrywania IAV. Następnie dodatkowo próbki będą badane testami multiplex real time PCR do typowania IAV. Pozwoli to na porównanie czułości typowania wirusów w obu rodzajach materiału. Z wybranych próbek zostanie wykonana amplifikacja kompletnych segmentów genomu. Amplikony segmentów oraz cDNA z wysoko dodatnich próbek ($Ct < 20$) będą poddane sekwencjonowaniu w NGS we współpracy z wiodącymi europejskimi laboratoriami?. Efektem tego będzie opracowanie wytycznych optymalnej procedury sekwencjonowania IAV z wymazów z nosa i płynu ustnego świń. W zadaniu 2 planuje się uzyskanie próbek z różnych grup wiekowych świń z 60 ferm. Próbkę będą badane jak wyżej opisano, co pozwoli na ocenę rozprzestrzenienia zakażeń IAV, szczególnie w fermach zakażonych subklinicznie, oraz na określenie dominujących podtypów. W zadaniu 3 wybrane próbki będą poddawane sekwencjonowaniu NGS według procedur opracowanych w zadaniu 1, a uzyskane sekwencje nukleotydowe będą poddane szczegółowym analizom bioinformatycznym. Ostatnie, zadanie 4, polegać będzie na analizie różnorodności genetycznej polskich szczepów IAV z ferm świń o różnej wielkości, lokalizacji geograficznej, typach produkcji, sezonie próbkowania i statusie szczepień przeciwko IAV. Ponadto planowana jest analiza i porównanie aktualnych sekwencji nukleotydowych szczepów IAV z Polski, Danii, Niemiec, Francji, Hiszpania i Włochy. Wynikiem projektu będzie opracowanie skutecznych procedur wykrywania i typowania IAV w płynie ustnym świń. Badania zmienności IAV nie były dotychczas prowadzone w Polsce na taką skalę i nie dotyczyły badania wirusów z ferm zakażonych enzootycznie. Dane uzyskane w trakcie realizacji projektu będą miały również znaczenia dla ogólnej wiedzy na temat zmienności wirusów grypy w Europie i pozwolą na określenie roli międzynarodowego transportu żywych świń w ewolucji wirusa.