

Prevalens och genetisk karaktärisering av Afrikansk svinpestvirus i vektorer och tamsvin i Uganda

Prevalence and genetic characterization of African swine
fever virus in vectors and domestic pigs in Uganda

Emilia Nyberg



Prevalens och genetisk karaktärisering av Afrikansksvinpest virus i vektorer och tamsvin i Uganda

Prevalence and genetic characterization of African swine fever virus in vectors and domestic pigs in Uganda

Handledare: Prof. Mikael Berg, Sveriges lantbruksuniversitet,
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Btr handledare: Dr. Karl Ståhl, Sveriges lantbruksuniversitet,
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Examinator: Prof. Sándor Belák, Sveriges lantbruksuniversitet,
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Omfattning: 15 hp

Nivå och fördjupning: C-nivå, G2E

Kurstitel: Självständigt arbete i biologi - kandidatarbete

Kurskod: EX0689

Program/utbildning: Agronomprogrammet - livsmedel

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2011

Omslagsbild: Grisar från Busia, Uganda, privat bild

Elektronisk publicering: <http://stud.epsilon.slu.se>

Nyckelord: Afrikansk svinpest, genetisk karaktärisering



Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Abstract

African swine fever, ASF, was first described 1921, in Kenya. The virus has thereafter spread through many African countries as well as in Europe, Asia, South- and Central America. The virus is spread via three different cycles, of which one is sylvatic and includes warthogs and soft ticks. The other two are between domestic pigs and the one most common one is caused by humans, who not always realize the seriousness of precautions. The infection manifests as hemorrhagic fever, but can also be more or less unnoticed.

The aim of this study was to use molecular tools to detect and partly genetically characterize ASFV both in soft ticks and in serum from domestic pigs in Uganda. Comparing viruses detected in ticks with those detected in domestic pigs I also wanted to investigate possible links between the sylvatic and domestic cycle.

The analysis was carried out by TaqMan PCR, with p72 as target gene, and sequencing of the positive PCR products.

The results from domestic pigs indicate that of genotype XI and X, the only genotypes earlier found in Uganda, IX was the only one detected in this study. Only one out of sixty ticks analyzed, were proven positive. The limited concentration of viral DNA detected in the positive tick, made it impossible to sequence the gene. ASFV is spread easily and vastly, causing enormous economic losses for both small- and big scale-production of pigs. It is therefore necessary to study the epidemiology of this disease to prevent spread of infection.

Keywords: African Swine fever, Uganda, genetic characterization

Innehållsförteckning

1	INTRODUKTION	7
2	MATERIAL OCH METODER	8
2.1	Prov och provinsamling	8
2.2	DNA-extraktion	8
2.3	Virusdetektion	9
2.4	Viruskaraktärisering	10
2.5	Fylogenetisk analys	10
3	RESULTAT	11
3.1	Virusdetektion	11
3.2	Genetisk karaktärisering och fylogeni	13
4	DISKUSSION	14
5	REFERENSER	15
6	Appendix	17

År 1921 beskrevs första gången Afrikansk svinpest (ASF) i Kenya (Montgomery, 1921). År 1957 spreds ASFV från Angola till Lissabon, Portugal, och orsakade det första utbrottet utanför Afrika. Sedan dess har flera utbrott utanför Afrika rapporterats, från Europa såväl som Asien, Sydamerika och Karibien (Bastos et al., 2003). Spridningen sker främst inom Afrika och i nuläget förekommer ASF mer eller mindre endemiskt i 20 av länderna söder om Sahara (Penrith, 2009). Tre olika cykler för spridning och bevarande av viruset i populationen finns beskrivna. En cykel mellan mjuka fästingar (av arten *Ornitodoros*) – och symptomfria infekterade vårtsvin. De andra två cyklarna återfinns i endemiska områden och cirkulerar mellan mjuka fästingar och tamsvin, samt infekterade tamgrisar emellan utan externt värdjur (Bastos et al., 2004). Infekterade tamsvin drabbas, vid kliniska symptom, av hemorragisk feber med hög dödlighet. Utan att ge symptom infekterar viruset vårtsvin (*Phacochoerus africanus*), busksvin (*Potamochoerus larvatus*) och fästingarten *Ornitodoros*. (Dixon et al., 2008). Spridning sker genom direktkontakt med smittade djur, kontaminerad utrustning eller via fästingar som vektorer. Smittorisken är också hög om infektionen leder till blodig diarré, vid otillräcklig desinfektion vid slakt och då grisar matas med slaktavfall och matrester (The Center for Food Security & public Health, 2010). Grishållning erbjuder en relativt billig proteinkälla med små krav på utrymme och är därför en viktig födokälla i fattiga områden. ASF medför förödande ekonomiska konsekvenser för både småskalig och kommersiell grisuppfödning (Bastos et al., 2003).

ASFV är ett ikosahedriskt, dubbelsträngat DNA virus och enda medlem av släktet Asfivirus inom familjen *Asfaviridae*. Replikationen utförs främst i cytoplasman (Van Regenmortel et al. 2000). Genomets längd varierar mellan 170 och 190 kilobaspar, beroende på tillägg och förluster i 5 prim och 3 prim – icke translaterade delarna på genomet (Blasco *et al.*, 1989). Enligt en studie av Bastos et al. (2006) visade sig den genetiska variationen i p72 vara så hög som 9.4% på nukleotidnivå vilket visar att genen är lämpad för molekylärepidemiologiska analyser. I denna studie användes TagMan-PCR enligt King et al. (2002) riktad mot den konserverade C-terminalen på p72 genen i virus, isolerade från serum och fästingar. Karaktärisering sker genom analys av homologi av genen. Nyligen utförda studier har också visat att sekvensering av genen p54 också är av vikt för karaktärisering av ASFV (Gallardo *et al.*, 2011) samt att de sedan tidigare karaktäriserade 22 genotyperna kan delas in i tre geografiska regioner. Genotyp IX och X är uteslutande återfunna i Östafrika (Boshoff, 2006). Metoden som används var TaqMan-PCR enligt King et al. (2002).

Denna studie är en del av ett större forskningsprojekt med syfte att undersöka AFSV epidemiologi, för att kunna kontrollera spridning. Syftet med studien är att genetiskt karaktärisera och utreda huruvida ASFV utbrotten i Uganda under 2010-2011 har ett samband, d.v.s. om de är orsakade av samma genotyp av viruset. Man vill också påvisa och karaktärisera AFS virus i mjuka fästingar, som ett första steg mot att förstå eventuella samband mellan de virus som cirkulerar i den sylvatiska cykeln och de som orsakar utbrott hos tamsvin.

2 MATERIAL OCH METODER

2.1 Prov och provinsamling

Materialet som analyserades bestod av fästingar och blodprover från grisar insamlade mellan år 2010 och 2011 i olika delar av Uganda. Hälften av blodproverna är tagna i samband med ett utbrott av ASF rapporterats och hälften är prover från kliniskt friska grisar. Provtagningen genomfördes genom att grisen hölls fast med grisfångare, såsom figur 1 visar. Vid svårt sjuka och försvagade djur



Figur 1 Blodprov tas från gris i Busia, Uganda. Foto: Matilda Brink

var grisfångare inte nödvändigt. Med hjälp av en vakutainer och serumrör togs serumprov. Proverna namngavs efter en trebokstavsförkortning av området provet togs från, ett nummer för vilken gård provet inhämtats samt en sista siffra för den individuella grisen, ex. MIT 2:1 för regionen Mityana. Serum separerades från blod genom centrifugering samma dag som provtagningen eller påföljande dag. De 101 proverna som analyserades förvarades i -20°C .

Fästingarna insamlades från vårtsvinsgrytgryt, med hjälp av spade och duk. De förvarades sedan i glasburkar märkta med insamlingsdatum och distrikt i

rumstemperatur. Antal fästingar från varje gryt varierade mellan 6 och 20 stycken, och för denna studie användes hälften av fästingarna från respektive gryt. Totalt analyserades 60 fästingar.

2.2 DNA-extraktion

Homogeniseringen utfördes på det molekylärbiologiska laboratoriet vid University of Makerere i Kampala. Tvåhundra μl serum användes från varje prov till DNA extraktionen.

DNA extraherades från merparten av proverna med DNeasy Blood & Tissue kit (QIAGEN) enligt tillverkarens bifogade protokoll "Purification of Total DNA from Animal Blood or Cells" varpå DNAt eluerades i 100 μl AE buffert. Även extraktionen utfördes på det molekylärbiologiska laboratoriet vid Makerere universitetet.

Från ett fåtal av proverna extraherades DNA med en kombination av TRIzol® och QIAmp DNA mini kit (QIAGEN). Back extraction buffer, BEB (Guanidine tiocyanat 4M, Natrium citrat 50 mM, Tris 1 M), tillsattes då den vattenlösliga RNA fasen avlägsnats från serum/TRIzol/kloroform-fasen. Proverna blandades genom 3

minuters invertering med påföljande centrifugering, $12\ 000 \times g$, 30 minuter. Den övre vattenlösliga fasen, innehållande DNA överfördes till ett nytt rör och blandades med motsvarande mängd 70 % etanol. Lösningen tillsattes en DNeasy Mini Spin Column och centrifugerades $12\ 000 \times g$ i 30 sekunder. Kolumnen tvättades med AW1 och AW2 buffert innan eluering med 50 μ l AE buffert.

Homogenisering av fästingarna utfördes på Makerere universitet genom att mortlas i 750 μ l TRIzol i 2 ml provrör, vilket figur 2 visar. Varpå såväl RNA som DNA extraherades.



Figur 2 Fästing i TRIzol före homogenisering.

RNA extraherades med TRIzol (Invitrogen) i kombination med Viral RNA mini kit (QIAGEN) och förvarades i $-80\ ^\circ\text{C}$ för framtida användning.

DNA extraherades sedan ur homogenatet. Efter att den vattenlösliga RNA fasen avlägsnats under RNA extraktionen tillsattes 0.75 ml BEB, rören inverterades i 3 minuter och centrifugerades sedan, $12\ 000 \times g$ i 30 minuter i rumstemperatur. Den undre, vattenlösliga, proteinfasen till-

sattes 0.4 ml isopropanol. Rören mixades och inkuberades 5 minuter i rumstemperatur. Proverna centrifugerades därefter, $12\ 000 \times g$, 15 minuter i $4\ ^\circ\text{C}$ varpå supernantanten avlägsnades. Pelleten tvättades genom tillsatts av 0.5 ml 70 % etanol genom invertering, innan centrifugering, $12\ 000 \times g$, 15 minuter i $4\ ^\circ\text{C}$. Därefter avlägsnades etanolen och pelleten löstes i 50 μ l $1 \times$ TE buffert. DNA:t förvarades slutligen i $-20\ ^\circ\text{C}$.

DNA extraherades också med QIAmp DNA mini kit kombinerat med protokoll av TRIzol på samma sätt som serumprover ovan.

2.3 Virusdetektion

För att detektera ASFV DNA användes TaqMan PCR. Målgenen för amplifieringen var strukturproteingenen p72. Primrar (sense: 5'-ATA GGA TTA AAA CCT ACC TGG AAC ATC TCC G-3' och antisense: 5'-GGT ACT GTA ACG CAG CAC AGC TGA ACC GTT CTG-3') samt TaqMan probe (5'-[6-karboxy-fluorescein (FAM)]-CCA CGG GAG GAA TAC CAA CCC AGT G-3'-[6-karboxy-tetrametyl-rhodamin (TAMRA)] beskrivna av King et al (2002) användes i denna studie.

Till respektive 25 μ l PCR reaktion användes: 0.4 μ M av vardera primer, 0.1 μ M TaqMan probe och 1x Path-ID qPCR Master Mix (Ambion).

Till respektive PCR reaktion tillsattes 2 μ l DNA, 4 μ l DNA användes ur isolatet från serumprover med påvisat svagare DNA koncentration.

Som positiv kontroll användes 2 µl DNA med 100 × spädning från bekräftat ASFV positiv gris. För negativ kontroll tillsattes TE buffert istället för DNA. Temperaturprofilen som användes var 50 cykler av 95 °C i 15 sekunder och 60 °C i 60 sekunder.

CT värdet definierades av antalet cykler som krävdes för att nå positiv indikation, d.v.s. över en definierad baslinje, som sattes till 0.05.

2.4 Viruskaraktärisering

Tjugofem µl av respektive positiv PCR-produkt tillsattes en 1.3% gel varpå banden visualiserades med UV-ljus (se fig. 4 i appendix). Banden skars ut och därefter extraherades produkten med hjälp av QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN).

De prover som genom gelelektrofores visade tillräcklig koncentration (se figur 5 i appendix) sekvenserades (Macrogen, Korea).

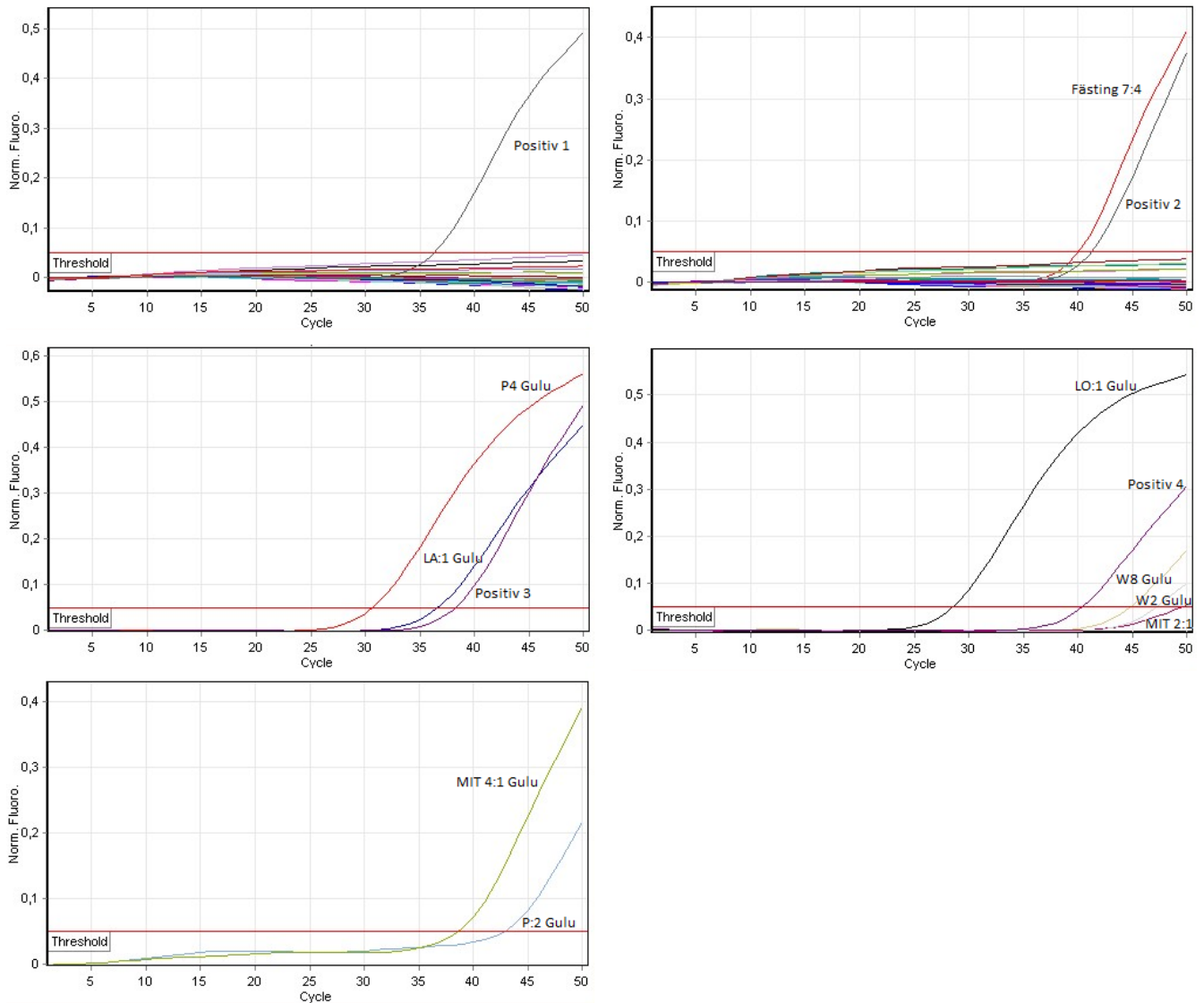
2.5 Fylogenetisk analys

De sekvenserade sekvenserna editerades med Laser gene 9.0 (DNASTar) En alignment gjordes sedan innehållande sekvenserna från denna studie och minst en representant från respektive genotyp (se tabell 2), av de 22 hittills kända p72 genotyperna, med BioEdit (www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/BioEdit.html). Ett fylogenetiskt träd konstruerades genom att använda MEGA version 4.0 med neighborjoining (Gallardo et al., 2009) och för att säkerställa statistiskt stöd användes ett bootstrapvärde på 1000.

3 RESULTAT

3.1 Virusdetektion

Av totalt 161 analyserade prover påvisades 9 stycken amplifieringsreaktioner positiva, vilket visas som en S-formad kurva. Figur 3 visar kvantifieringsdata för genomförda reaktioner. Uppmätta CT värden, förtydligas i tabell 1.



Figur 3 Resultat av RT-PCR. Graferna visar 13 stycken positiva svar, varav 4 stycken är positivkontroll. Gränsvärdet sattes konsekvent till CT 0,005.

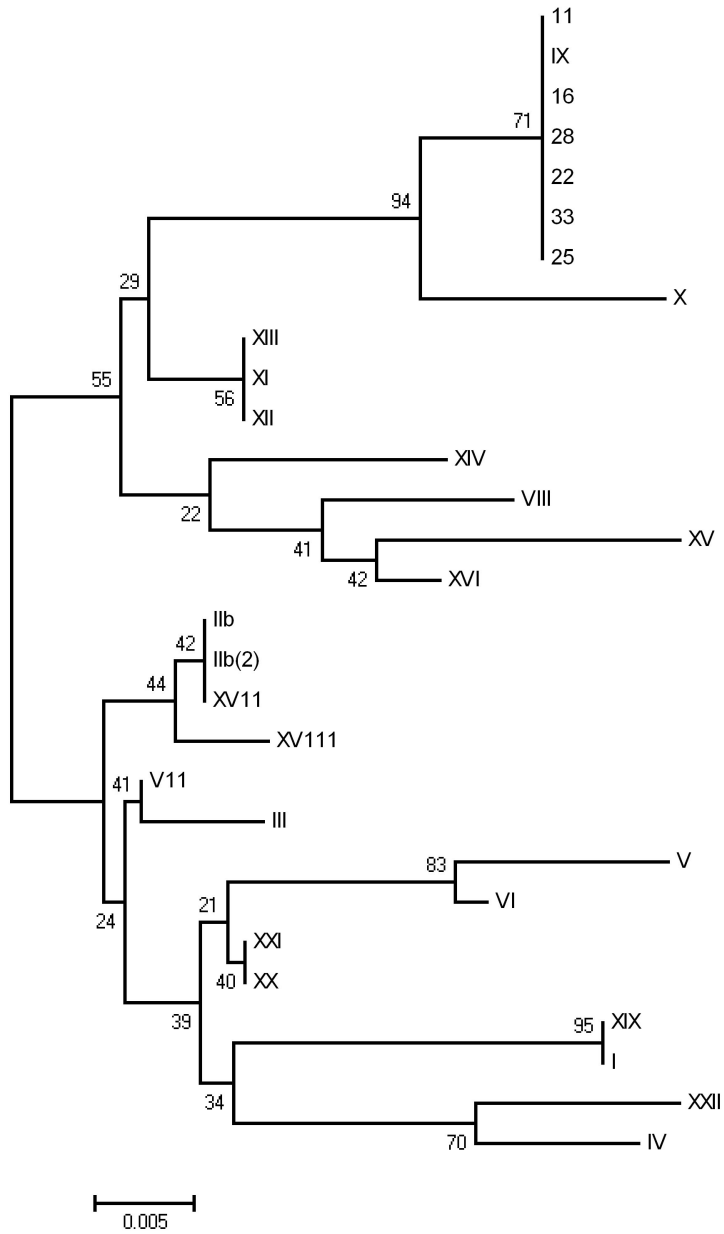
Tabell 1 Positiva prover med CT-värde

ID	Cykliskt gränsvärde, CT
Fästing	40,08
25	36,66
33	30,67
11	28,55
13	44,80
27	49,55
28	47,17
16	42,88
22	38,61
Positiv kontroll	39,04*

*Medelvärde av positiva kontroller.

3.2 Genetisk karaktärisering och fylogeni

Genetisk karaktärisering visar att de 9 positiva proverna härstammar ur genotyp IX.
Detta tydliggörs i den fylogenetiska konstruktionen, figur 4.



Figur 4 Fylogenetiskt träd. Tidigare kända genotyper tillsammans med analyserade gener i denna studie.

4 DISKUSSION

Denna studie visade att 9 av 161 analyserade prover var positiva. Ett väntat resultat då hälften av proverna var hämtade från kliniskt friska grisar i områden utan ASF-utbrott. Den andra hälften av proverna härstammade från avklingande utbrott, och bestod därmed av färre antal positiva djur. Uppmätta CT-värden närmar sig detektionsgränsen, 40, detta påvisar svagt positiv detektion. Övriga svaga, men ändå positiva prover, kan därigenom ha försummats. Tydligt samband kunde dock ses mellan kliniska symptom, kort livslängd efter provtagning och koncentration av virus. Prov 11, 33 och 25 var de med lägst CT-värde samt visade starkast band efter gelelektrofores (se figur 6). Dessa grisar var svårt sjuka och dog bara någon dag efter provtagning.

Den positivt testade fästingen kunde till följd av låg koncentration dessvärre inte sekvenseras. Den fylogenetiska analysen visar att alla sekvenserade prover var av genotyp IX och med 100 % inbördes likhet. För att öka tyngden i resultatet av det fylogenetiska trädet bör fler, tidigare funna, sekvenser av de 22 olika ASF-genotyperna utnyttjas. Framst av genotyp IX och X då dessa är de genotyper som i tidigare studier detekterats i Uganda (Bastos et al. 2003).

Det hade varit intressant att veta vilken genotyp fästingen var bärare av, om det var genotyp IX hade det kunnat indikera ett samspel mellan den ickesylvatiska och sylvatiska cykeln. År 2005 påvisade exempelvis Lubisi et al. närvaro av genotyp X i både vårtsvin, tamsvin och fästingar från prover tagna mellan 1954 och 1995. Det vore intressant om man kunnat se en liknande korrelation från nytagna prover.

Utifrån dessa resultat ser utbrottet 2010 och 2011 ut att tyda på att de är orsakade av samma virus, men då C-terminala änden av p72 är en relativt konserverad region ger det inte hela sanningen. Man kan exempelvis, utöver p72, även sekvensera p54. För att få högre säkerhet i släktskap hade man också kunnat analysera en mer variabel region, som den centralvariabla regionen (CVR) i B602L genen (Gallardo et al., 2009).

Afrikansk svinpest kan innebära en stor fara på flera plan, både sett ur mindre perspektiv beträffande mindre bemedlad landsbygd och ur större synvinkel som exempelvis gällande biologisk krigsföring. Fortsättningsvis bör utredning av ASFV epidemiologi utredas med målet att förhindra spridning och möjligheten att ta fram ett vaccin.

5 REFERENSER

Bastos, A.D.S., Penrith, M. – L., Crucière, C., Edrich, J.L., Hutchings, G., Roger, F., Couacy-Haymann, E., Thomson, G.R. (2003) 'Genotyping field strains of African swine fever virus by partial P72 gene characterization', *Archives of Virology*, vol. 148, 4, 693-706.

Bastos, A.D.S., Penrith, M. – L., Macome, F., Pinto, F., Thomson, G.R (2004) 'Co-circulation of two genetically distinct viruses in an outbreak of African swine fever in Mozambique: no evidence for individual co-infection', *Veterinary Microbiology*, vol. 103, 3-4, 169-182

Blasco R, Aguero M, Almendral JM, Viñuela E (1989) 'Variable and constant regions in African swine fever virus DNA', *Virology* 168: 330–338

Boshoff, C.I., Bastos, A.D.S., Gerber, L.J., Sonenshine, D.E. (2005) 'Genetic characterization of African swine fever viruses from outbreaks in southern Africa (1973-1999)', *Veterinary microbiology* 121, 45-55.

Dixon, L.K., Abrams, C.C., Chapman, D.G., Zhang, F. (2008). *I Animal viruses molecular biology*. Caister academic press, Norwich, Storbritannien, 457-521

Gallardo C, Mwaengo D.M., Macharia J.M., Arias M, Taracha E.A., Soler A, Okoth E., Martín E., Kasiti J., Bishop R.P. (2009). 'Enhanced discrimination of African swine fever virus isolates through nucleotide sequencing of the p54, p72, and pB602L (CVR) genes', *Virus Genes*, 38(1): 85-95.

Gallardo, C., Ademun, A.R., Nieto, R., Nantima, N., Arias, M., Martín, E., Pelayo, V., Bishop, R.P. (2011). 'Genotyping of African swine fever virus (ASFV) isolates associated with disease outbreaks in Uganda in 2007' *African Journal of Biotechnology* vol. 10(17) 3488-3497.

King, D.P., Reid, S.M., Hutchings, G. H., Grierson, S.S., Wilkinson, P.J., Dixon, L.K., Bastos, A.D., Drew, T.W. (2003) 'Development of a TaqMan® PCR assay with internal amplification control for the detection of African swine fever virus', *Journal of virological methods* 107, 53-61.

Lubisi, B.A., Bastos, A.D.S., Dwarka, R.M., Vosloo, W. (2005) 'Molecular epidemiology of African swine fever in East Africa', *Archives of Virology*, 150, 2439-2452.

The Center for Food Security & public Health, Iowa State University (2010) African Swine Fever. Tillgänglig: http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/african_swine_fever.pdf [2011-05-12]

Van Regenmortel, M.H.V., Fauquet, C.M., bishop, D.H.L., Carstens, E., Estes, M.K., Lemon, S., Maniloff, J., Mayo, M.A., McGeoch, D.J., Pringle, C.R., Wickner, R. (2000) 'Virus taxonomy: Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic press, London, s. 159-165.

Tack

För att uppsatsen och resan till Uganda blivit möjlig vill jag tacka min handledare Dr. Karl Ståhl med kollegor för handledning vid Makerere Universitetet i Kampala för kunskap om både afrikansk svinpest och landet Uganda, Professor Mikael Berg som inkluderade mig i projektet samt Dr. Anne-Lie Blomström för outhärlig hjälp under laborativt- och skriftligt arbete. Avslutningsvis tack till min vän, studie- och resekamrat Matilda Brink för att ha gjort den fantastiska resan extra
angenäm.

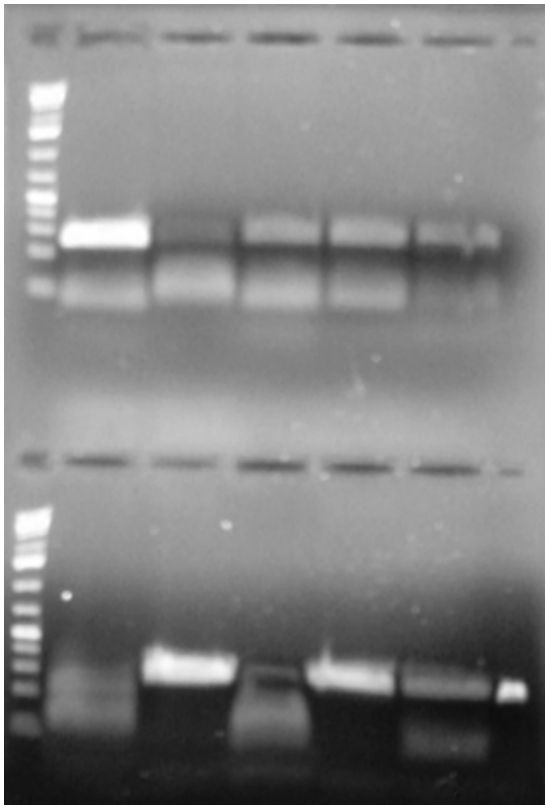
Ekonomiskt stöd från SLU, Sida, Formas, Utrikesdepartementet samt personligt bidrag från Hemdalls Hjälp & Stipendiefond gjorde resan möjlig.

6 Appendix

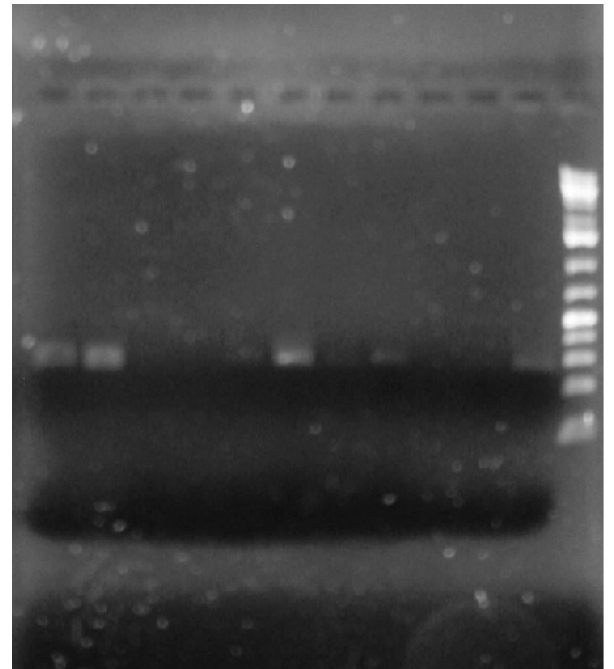
Tabell 2 Tabellen anger källor till gener av olika genotyper som använts för fylogenetisk analys samt studiens undersökta gensekvenser

P72 genotyp	Virus namn	Geografiskt ursprung	Insamlings år	P72 Genbank acc.nummer	Referens
I	SPEC/205	Windhoek, Namibia	1989	DQ250114	Boshoff et al. (2007)
IIa	MAD/1/98	Madagaskar	1998	AF270706	Bastos et al. (2003)
IIb	MOZ/60-98	Tete, Moçambique	1998	AY274455	Bastos et al. (2003)
III	BOT/1/99	Sherwood, Botswana	1999	AF504886	Bastos et al. (2003)
IV	RSA/1/9_Wb	Sydafrika	1999	AF302818	Bastos et al. (2003)
V	MOZ/1960a	Tete, Moçambique	1960	AF270708	Bastos et al. (2003)
VI	SPEC/265	Maputo, Moçambique	1994	AF270710	Bastos et al. (2003)
VII	SPEC/260	Thabazimbi, Sydafrika	1993	DQ250121	Boshoff et al. (2006)
VIII	MOZ/A-98	Tete, Moçambique	1998	AY274452	Bastos et al. (2003)
IX	UGA/1/95a	Uganda	1995	AF449475	Bastos et al. (2003)
X	UGA/3/95a	Uganda	1995	AF449476	Bastos et al. (2003)
IX	KAB/6/2ba,c	Zambia	1983	AY351522	Lubisi et al. (2005)
XII	MZI/92/1a	Malawi	1992	AY351543	Lubisi et al. (2005)
XIII	SUM/14/11a,c	Zambia	1983	AY351542	Lubisi et al. (2005)
XIV	NYA/1/2a,c	Zambia	1986	AY351555	Lubisi et al. (2005)
XV	TAN/1/01	Tanzania	2001	AY494552	Lubisi et al. (2005)
XVI	TAN/2003/1	Tanzania	2003	AY494550	Lubisi et al. (2005)
XVII	ZIM/92/a	Gweru Midlands, Zimbabwe	1992	DQ250119	Boshoff et al. (2007)
XVIII	NAM/1/95	Windhoek, Namibia	1995	DQ250122	Boshoff et al. (2007)
XIX	SPEC/125	Ellisras, Sydafrika	1987	DQ250112	Boshoff et al. (2007)
XX	RSA/1/95	Hoedspruit, Sydafrika	1995	DQ250123	Boshoff et al. (2007)

XXI	SPEC/53	Letaba, Sydafrika	1985	DQ250111	Boshoff et al. (2007)
XXII	SPEC/245	Louis Trichardt, Sydafrika	1992	DQ250117	Boshoff et al. (2007)
IX	22 MIT 4:1	Mitaya, Uganda	2011		Denna studie
IX	33 – P4 Gulu	Gulu Uganda	2011		Denna studie
IX	16 - P1:2 Gulu	Gulu, Uganda	2011		Denna studie
IX	11 -LO1 gulu	Gulu, Uganda	2011		Denna studie
IX	25 - LA1 gulu	Gulu, Uganda	2011		Denna studie
IX	28- W2 Gulu	Gulu, Uganda	2010		Denna studie



Figur 5 Utförd elektrofores med PCR-produkt visualiserat genom UV- kamera. Första raden från vänster: stege, 11, 27, 16, 13, 28. Andra raden från vänster: stege, fästing, 33, -, 25, 22, positiv kontroll.



Figur 6 Utförd elektrofores med isolerat DNA, synliggjort genom UV- kamera. Från vänster: 25, 33, 27, -, 28, 11, 16, 22, fästing, 13, positiv kontroll, stege.