



Projekti „SAK viiruse vastupidavust looduslikus keskkonnas soodustavad tegurid,, lõpparuanne:

Projektijuht: **ARVO VILTROP**
(*ees- ja perekonnanimi*)

Asutus: **EESTI MAAÜLIKOOL**
(*programmis lubatud taotleja*)

Projektijuhi kontaktandmed: 7313210, Kreutzwaldi 62, 51014 Tartu; arvo.viltrop@emu.ee
(*telefon, posti ja e-posti aadress*)

Projektitulemuste lühikokkuvõte:

Uuringu tulemused kinnitavad, et nakatunud metssigade korjused on oluline roll nakkuse levikul metsseapopulatsioonides ja nende kiire eemaldamine loodusest on oluline meede nakkuse leviku tõkestamiseks.

Nakatunud metssigade korjustest pärinev SAK viirus püsib pinnases tõenäoliselt nakkusvõimelisena pikka aega. Seeläbi on pinnas oluliseks nakkuse allikaks ning nakkuse ülekanderiskide vähendamiseks on vaja tõhustada bioturvalisuse meetmeid.

Valdav osa Eestis tsirkuleerivatest viirusetüvedest on B602L geeni nt-järjestuste alusel eristamatud. Eestis kaks viiruse tüve, mis on eristatavad ülejäänuist (Genotype II CVR-2 ja Genotype II CVR-1 SNP-1).

(tulemused, soovitusel, kuni 600 tähekohta)

Projektitulemuste lühikokkuvõte inglise keeles:

The results of the study confirm, that carcasses of infected wild boar are playing an important role in spreading of the ASF infection in wild boar populations and their prompt removal is an import measure to limit the spread of the infection.

The ASF virus excreted from infected carcasses can potentially stay infectious in soil for prolonged periods. Thus the soil may be an important source of infection meaning that to reduce the risks of indirect transmission of the virus the biosecurity measures need to be strengthened.

Majority of the ASF virus strains belong to the same subtype based on the sequence of B602L gene. Two strains that are different from those have been identified in Estonia: Genotype II CVR-2 and Genotype II CVR-1 SNP-1.

(tulemused, soovitusel, kuni 600 tähekohta)

Projektis esitatud eesmärkide saavutamine (sh kasutatud meetoodika):

Uuringu lähteülesanne sisaldas kolme peamist eesmärki:

1. Selgitada viiruse püsivust keskkonnas põhja parasvöötme tingimistes peatähelepanuga hukkunud metssigade korjustest tekkiva saaste küsimuste selgitamisele.

Selle eesmärgi saavutamiseks koguti pinnaseproove nakatunud hukkunud metssigade korjuste leidmispaigast (nakatumine kinnitatud VTL-s) pärast korjuste eemaldamist. Kokku koguti proove 11 metsseakorjuse leidmispaigast. Proove koguti ca 2- nädalase intervalliga seni kuni proovist ei tuvastatud enam SAK viiruse DNA signaali.

Pinnaseproovidest eraldati spetsiaalse eralduskitiga (*PowerSoil DNA Isolation Kit*) kogu pinnases leiduv mikroobne DNA. Proove uuriti SAK viiruse DNA suhtes qPCR meetodil Veterinaar- ja Toidulaboratooriumis (Meetoodika avaldatud: *Tignon M, Gallardo C, Iscaro C, Hutet E, Van der Stede Y, Kolbasov D, et al. Development and inter-laboratory validation study of an improved new real-time PCR assay with internal control for detection and laboratory diagnosis of African swine fever virus. J Virol Methods 2011;178: 161-170*).

Positiivsete proovide DNA sekveneeriti viirustüvede tüpiseerimiseks, milleks kasutati viiruse B602L geeni CVR piirkonnast. (Meetoodika avaldatud: *Gallardo C, Anchuelo R, Pelayo V, Poudevigne F, Leon T, Nzoussi J, et al. African Swine Fever Virus p72 Genotype IX in Domestic Pigs, Congo, 2009. Emerg Infect Dis. 2011;17(8):1556-1558*). Viirustüvede tüüp määrati võrdleva fülogeneetilise analüüsi abil, kus anud tüvesid võrreldi varem tüpiseeritud tüvedega.

2. Selgitada SAK viiruse püsivust keskkonnas erinevatel aastaegadel ning võimalikke keskkonnategureid, mille vahendusel nakkus võib levida metssigadelt kodusigadele sh. metsseakorjuste looduses püsivust, viiruse püsivust teraviljas.

Metssea korjuse püsivus keskkonnas: Viidi läbi katsed 3 nakatumata metssea korjusega Hiiumaal ja ühega Läänemaal. Korjuseid jälgiti rajakaamerate abil ja registreeriti millised looma ja linnuliigid korjusest toituvad ning kas, kui sagedased ja mis laadi on metssigade kontaktid metsseakorjustega.

3. Selgitada projekti käigus tuvastatud viirustüvede fülogeneetilist sugulust varem isoleeritud tüvedega.

Uuritavate viirustüvede tüpiseerimiseks viidi läbi fülogeneetiline analüüs viirustüvede DNA järjestuste alusel.

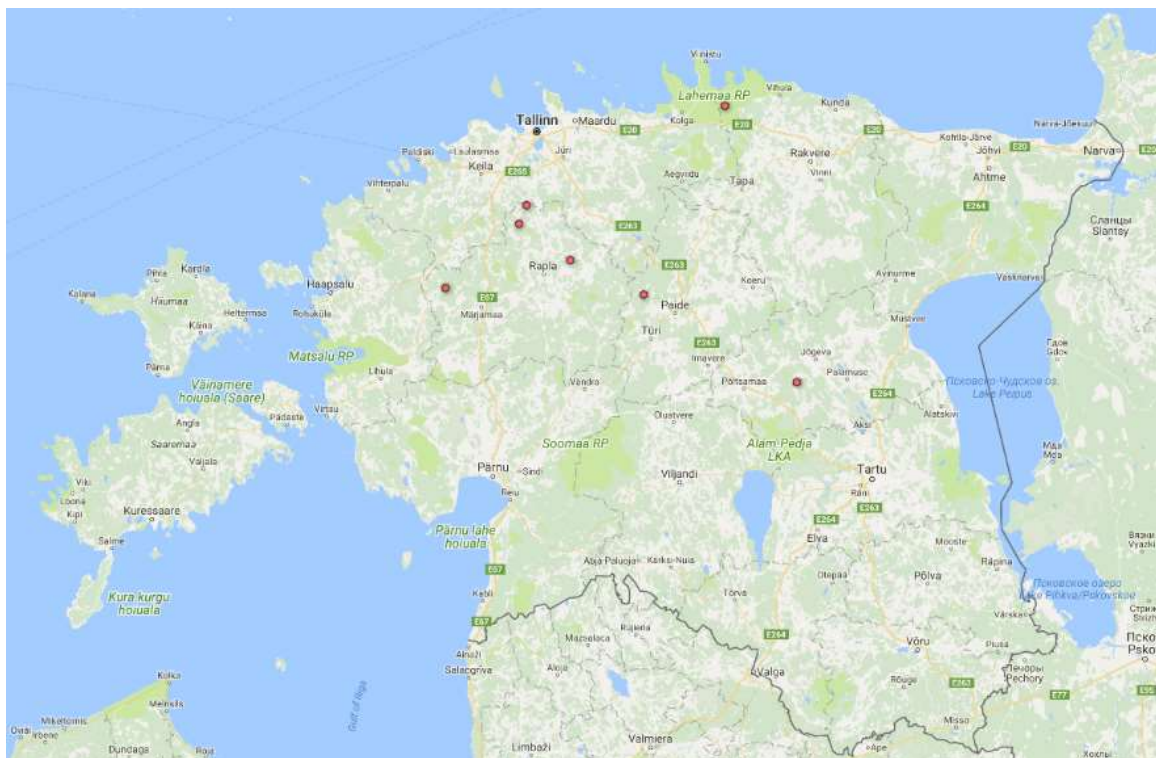
Puu koostati B602L geeni keskse varieeruva piirkonna järjestuste alusel. Analüüsi lisati võrdluseks viirustüvede DNA järjestusi SAK-i referentslabori andmebaasist (<http://asf-referencelab.info/asf/en/sequence-data-base/bd-virus>). Igast genotüübist võeti analüüsi ainult need järjestused, mis ei ole identsed. Puu koostati Maksimaalse tõenäosuse (*Maximum Likelihood*) meetodil Jukes-Cantor mudeli järgi kasutades MEGA 7.0.26 tarkvara. Puu hargnemiskohtades on toodud Bootstrap analüüsi (500 kordust) väärtused, mis on suuremad kui 30. Puu on kondenseeritud nii, et alla 30 Bootstrap väärtusega harude pikkus on arvestatud 0-ks.

Uuringu tulemused:

1) SAK viiruse püsivus keskkonnas:

Kokku koguti 11 korjuse lamamispaikest 107 pinnaseproovi. Korjuste leiupaikade jaotumine Eesti territooriumil on toodud joonisel 1.

Proovide uurimise tulemused on esitatud tabelis 1.



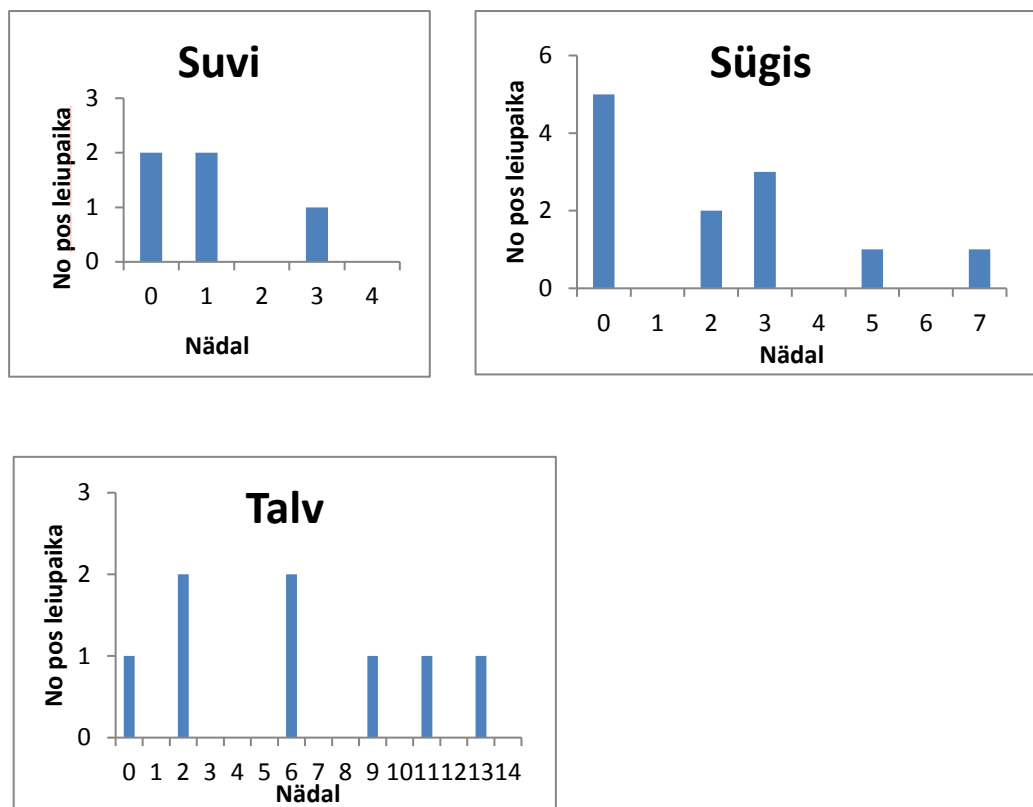
Joonis 1. SAK viirusega nakatunud metsseakorjuste, mille asukohast koguti proovid SAKV püsivuse uuringuks pinnases paiknemine

Tabel 1. Pinnaseproovide SAK viiruse DNA-le uurimise tulemused

Proovivõtu koht/kuupäev	Proovide arv	Positiivsete proovide arv	Korjuse seisund
V1 kokku	6	4	Täiskasvanud emis. Korjus värske. Vanus 1-2 päeva. Paiknes päikese käes
1.07.2016	2	2	
8.07.2016	2	1	
16.07.2016	2	1	
V2 kokku	4	0	Täiskasvanud emis. Värske korjus (1-2 päeva). Paikneb varjus puude all
1.07.2016	2	0	
8.07.2016	2	0	
V3 kokku	4	1	Täiskasvanud emis. Korjus tugevalt lagunenu. Asub varjus pude all. Vanus ca 1 nädal.
1.07.2016	2	0	
8.07.2016	2	1	
V4 kokku	8	0	Korjustest järel luustik. Korjuse vanus ca 1,5 kuud.
29.07.2016	2	0	

5.08.2016	2	0	
11.08.2016	2	0	
19.08.2016	2	0	
H1 kokku	12	8	Korjus värske. Veritsemist polnud. Laiba vanus ca 1-2 päeva.
10.10.2016	3	3	
19.10.2016	3	2	
31.10.2016	3	2	
22.11.2016	3	1	
O1 kokku	9	2	Korjus värske. Seakatku tunnused: silmad ja igemed veritsetsid, verevalumid limaskestl, punetasid kube ja kaenlaalused. Laiba vanus ca 1 päev.
4.10.2016	3	1	
19.10.2016	3	1	
31.10.2016	3	0	
SA1 kokku	9	3	Korjus värske, kuid teiste loomade poolt on puretud tagakeha. Seakatku tunnused: silmad ja igemed veritsetsid, verevalumid limaskestl, kaenlaalused punetasid. Korjus leitud eelmise päeva õhtul. Laiba vanus 2-3 päeva.
12.10.2016	3	2	
21.10.2016	3	0	
31.10.2016	3	1	
SO1 kokku	4	1	Korjus värske, aga puretud teiste loomade poolt tagakeha ja pead. Veritsemisest märke polnud. Laiba vanus 2-3 päeva. Leidmiskoht üle küntud
10.10.2016	3	1	
19.10.2016	1	0	
VII kokku	9	5	Korjus värske, kuid teiste loomade poolt on söödud tagakeha. Verevalumid kaenla all, silmas nõre. Korjus leitud 3 päeva tagasi, Laiba vanus 3-4 päeva.
19.10.2016	3	2	
31.10.2016	3	2	
22.11.2016	3	1	
US1 kokku	21	9	Korjusest alles luustik. Korjuse vanus > 1 kuu
8.02.2017	3	3	
22.02.2017	3	3	
17.03.2017	3	1	
6.04.2017	3	1	
26.04.2017	3	0	
10.05.2017	3	0	
30.05.2017	3	1	
US2 kokku	21	14	Pool keha söödud, ülejäänud külmunud Korjuse vanus 2-3 nädalat
8.02.2017	3	1	
17.02.2017	1	1	
22.02.2017	3	1	
17.03.2017	2	2	
6.04.2017	3	3	
26.04.2017	3	2	
10.05.2017	3	3	
30.05.2017	3	1	
Kõik kokku	107	47	

Joonisel kaks on esitatud andmed viiruse DNA püsivuse kohta pinnases aastaajati. Näidatud on positiivsete korjuse leiupaikade arv vastaval aastaajal.



Joonis 2. SAK viiruse DNA le positiivsete nakatunud metsseakorjaste leiupaikade arv erinevatel aastaegadel.

Lisaks koguti 2016. aasta suvel nakatunud metsseakorjaste leiupaikadest vihmausse (kokku 7 korral). Ühestki vihmaussist SAK viiruse DNA-d ei tuvastatud.

Samuti uuriti nakatunud alal paiknevalt söödaplatsilt pärineva teravilja proove. Ühestki proovist SAK viiruse DNA-d ei tuvastatud.

Uuringu tulemustest selgub, et viiruse DNA on avastatav korjustest saastunud pinnases pikka aega pärast korjaste eemaldamist. Viiruse DNA esinemine pinnases ei tähenda otseselt seda, et pinnas oleks ka nakkuslik. Ometi tõendab see, et viirus jõuab korjustest pinnasesse, mistõttu on pinnas potentsiaalselt ka nakkuse allikas. Mida madalam on temperatuur seda kauem viiruse DNA on tuvastav. Samuti on pinnase saastatus sõltuvuses korjuse eemaldamise kiirusest. Mida kiiremini korjus eemaldatakse seda vähem jõuab keskkond saastuda.

2) Metsseakorjaste püsivus keskkonnas ja metssigade kontaktid korjustega

Kokku jälgiti viit kütitud metssea korjust, mis olid paigutatud metssigade käiguradade lähedusse. Kõik korjused olid uuritud SAK viiruse nakkuse suhtes ning negatiivsed. Nelja korjust jälgiti Hiiumaal Emmaste vallas, ühte Läänemaal Lihula vallas. Et Läänemaal piirkonnas, kus katset läbi viidi oli vahetult enne katse algust alanud SAK epideemia metssigade hulgas, siis metssigade arvukus oli piirkonnas järsult vähenenud. Ilmselt seetõttu ühtegi metssiga korjuse juures ei nähtud. Hiiumaal registreeriti metssigade kontakte korjustega korduvalt.

Peamised looma ja linnuliigid, kes korjustest toitunud olid:

- kährikkoer, rebane
- ronk, vares, kotkad, kullid

Tabelis 2 on esitatud andmed korjuste püsivuse kohta looduses erinevatel aastaegadel. Tabelis toodud andmed näitavad pehmete kudede hävimise aega. Luustik ja nahk püsivad siiski veel nädalaid pärast pehmete kudede kadumist. Seega püsib potentsiaalselt viirust sisaldav materjal looduses oluliselt kauem.

Tabel 2. Metssea korjuste püsivus looduses

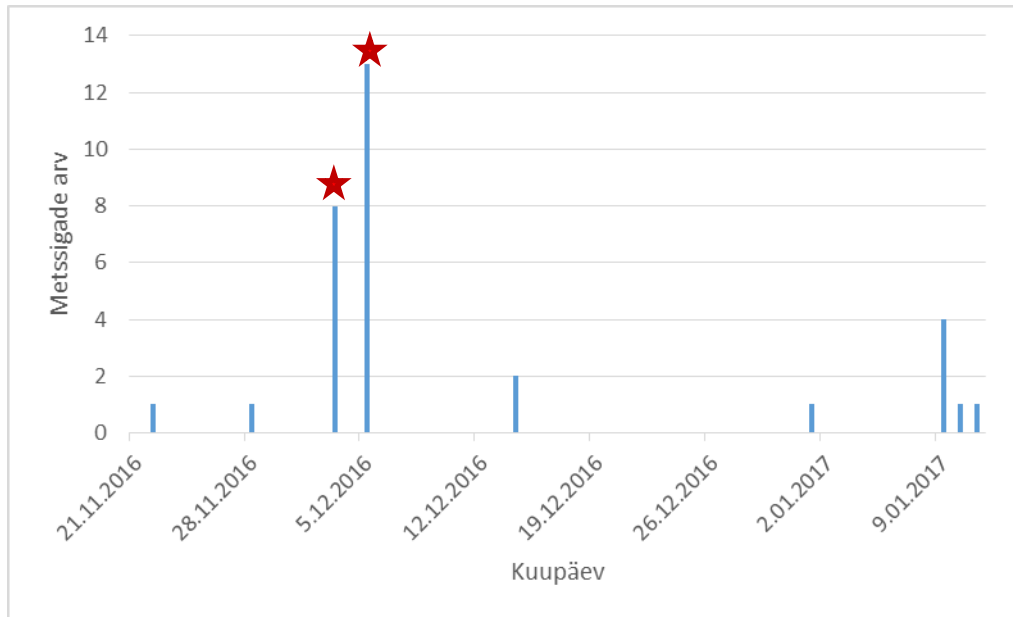
Jrk nr	Paigaldamise kuupäev	Pehmete kudede hävimise kuupäev	Püsivus nädalates
Korjus 1	21.11.2016	28.12.2016	5,5
Korjus 2	12.01.2017	29.01.2017	2,5
Korjus 3	13.02.2017	04.04.2017	7
Korjus 4	06.08.2017	17.08.2017	1,5

Tabelis 3 on esitatud andmed metssigade kontaktide kohta korjuste, nende jäänuste ja korjuste aluse pinnasega. Andmetest selgub, et otsesed kontaktid korjustega ei ole sagedased. Sagedamini kontakteeruvad korjusega põrsad ja kesikud. Korjuse värskuse osas ei näi olevat eelistust väljaarvatud tõsiasi, et kõige sagedamini tuhnivad sead korjuste jäänustes – luustikus ja nahajäänustes. Kontaktid korjustega on reeglina lühiajalised – 1-3 minutit. Otseselt korjuste söömist ei esine. Siiski võib eeldada, et kontakt korjustega on piisavalt intensiivne, et saaks toimuda viiruse ülekande.

Tabel 3. Metssigade kontaktid korjuste, korjuste jäänuste ja pinnasega korjuste all

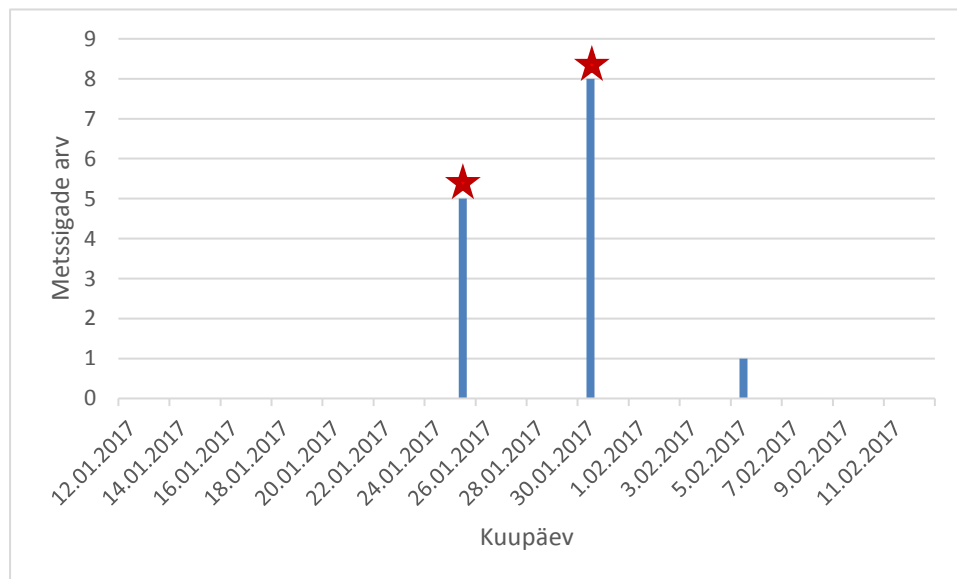
Jrk nr	Paigaldamise kuupäev	Pehmete kudede hävimise kuupäev	Vaatlusperioodi lõppkuupäev	Metssigade viibimine korjuste läheduses (külastuste arv)	Kontakt korjusega (arv)	Kontakt korjuste jäänuste ja pinnasega (arv)
Korjus 1	21.11.2016	28.12.2016	11.01.2017	10	2	1
Korjus 2	12.01.2017	29.01.2017	12.02.2017	3	2	1
Korjus 3	13.02.2017	04.04.2017	5.08.2017	42	2	23
Korjus 4	06.08.2017	17.08.2017	18.10.2017	20	1	16

Joonistel 3-8 on esitatud metssigade külastused korjuste asupaika ajalises perspektiivis. Tärniga on tähistatud otsesed kontaktid korjusega.

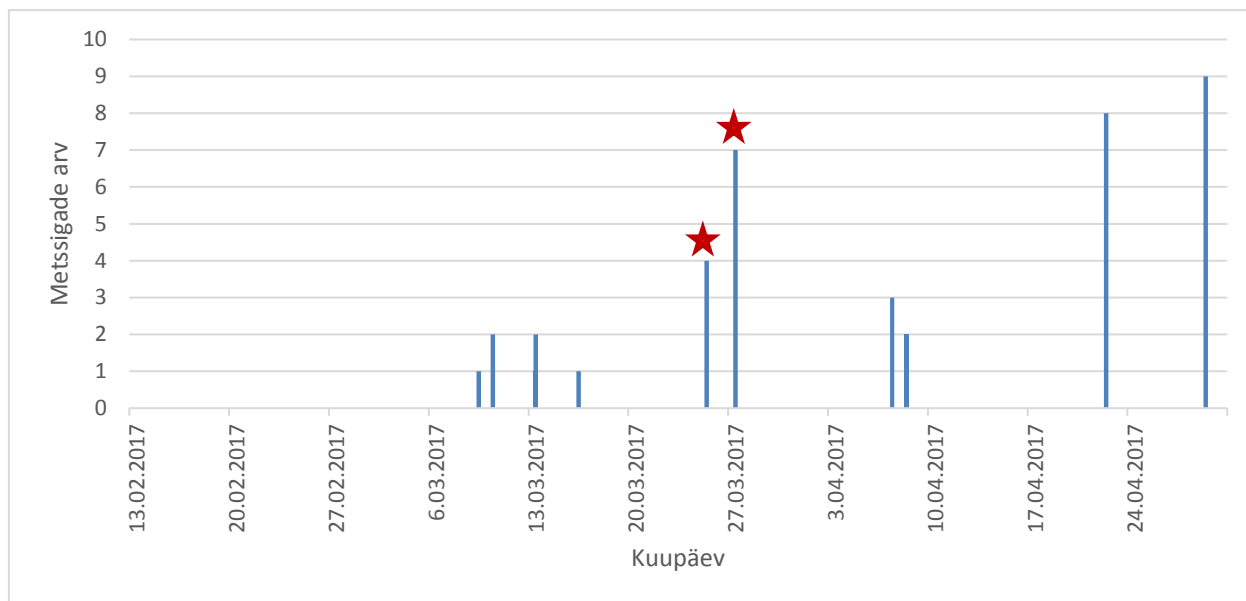


Joonis 3. Metssigade viibimine korjuse läheduses ja otsene kontakt korjusega 21.11.16-11.01.2017

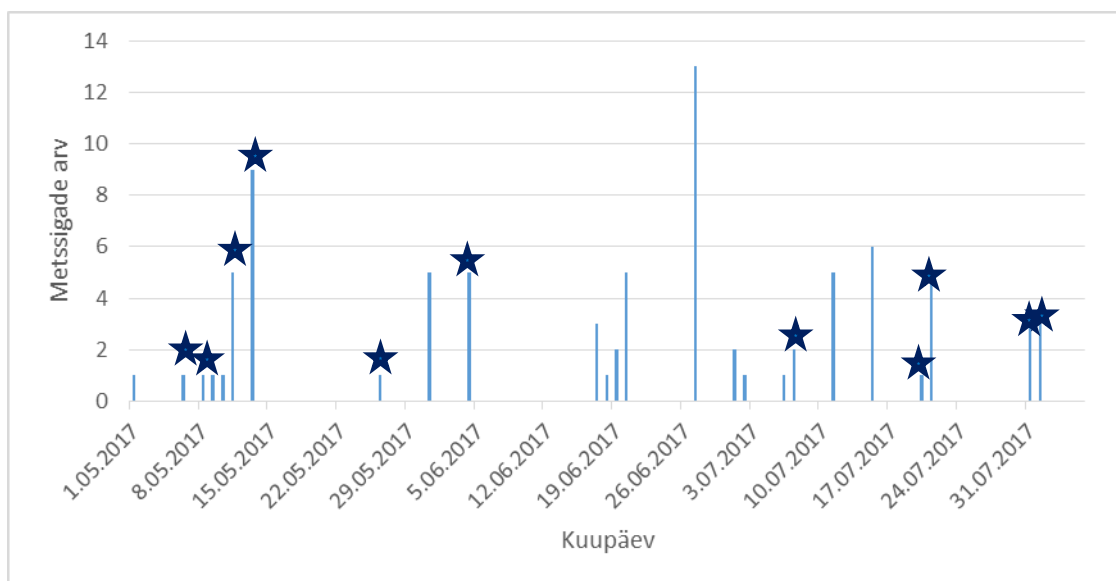
★ - metssigade otsene kontakt korjusega



Joonis 4. Metssigade viibimine korjuse läheduses ja otsene kontakt korjusega 12.01.2017-12.02.2017

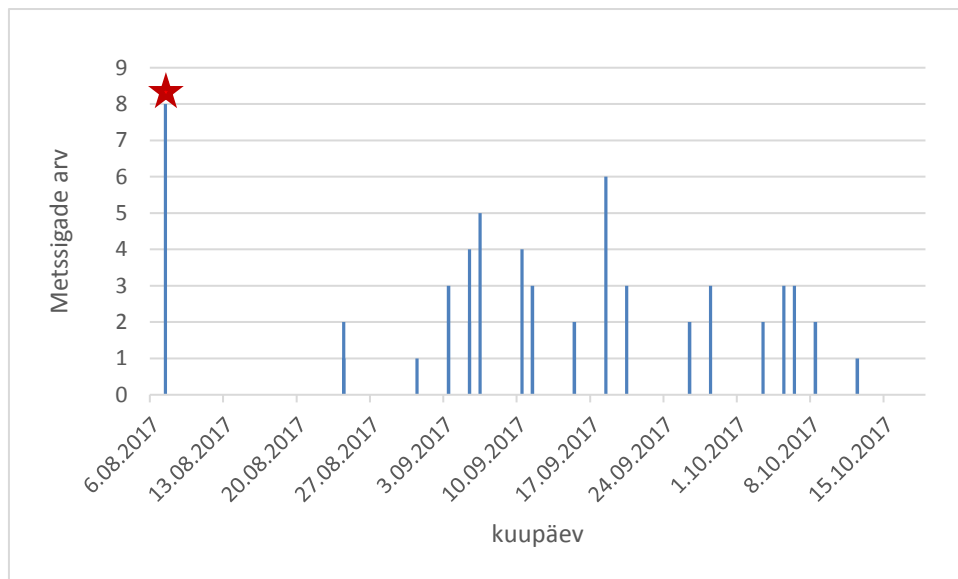


Joonis 5. Metssigade viibimine korjuse läheduses ja otsene kontakt korjusega 13.02.2017-30.04.2017



Joonis 6. Metssigade viibimine korjuse läheduses ja otsene kontakt korjuse jäänustega 01.05.2017-5.08.2017

★ - kontakt korjuse jäänustega

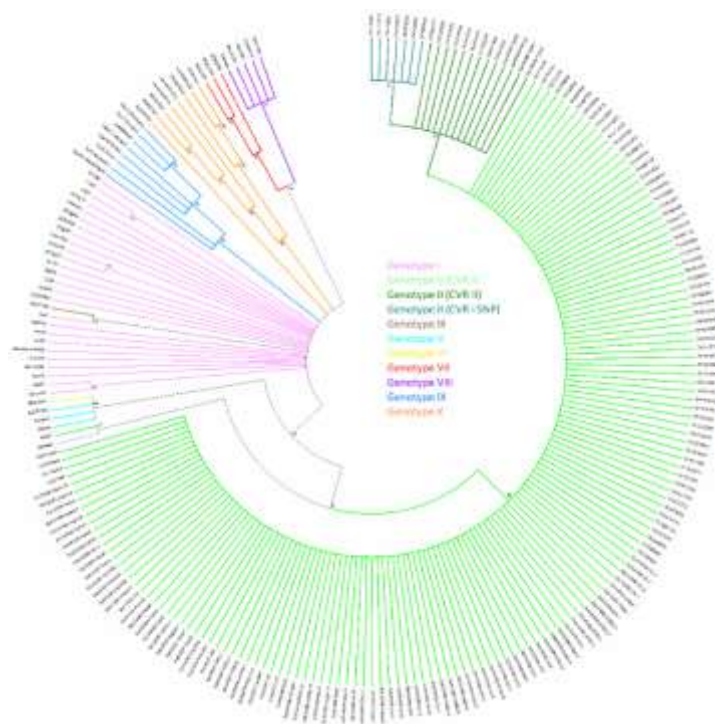


Joonis 7. Metssigade viibimine korjuse läheduses ja otsene kontakt korjusega 06.08.2017-18.10.2017

Esitatud andmed viitavad sellele, et metssigade kontaktid korjuse asupaikadega sagenevad kevadsuvisel perioodil. Kontaktid on suhteliselt sagedased kuni oktoobri lõpuni. Hilissügisel ja talvel on kontaktid harvemad. See võib seletada nakkuse kiiremat levikut kevadsuvisel perioodil.

3) Tuvastatud viirustüvede fülogeneetiline analüüs

Fülogeneetilise analüüsi tulemused on esitatud joonisel 8 toodud fülogeneetilises puus.



Joonis 8. Sigade Aafrika katku viiruse Eesti tüvede fülogeneetiline puu B602L geeni keskse varieeruva piirkonna nukleotiidjärjestuste alusel võrdluses mujal isoleeritud tüvedega

Esitatud andmetest selgub, et valdav osa Eestis tsirkuleerivatest viirusetüvedest on antud geenilookuse järjestuse alusel eristamatud - Genotype II (CVR 1). Siiski on Eestis kaks viiruse tüve, mis on eristatavad ülejäänuiust. Üks neist levis 2015. aastal Tartumaal Genotype II (CVR 2) piiratud alal Võrtsjärve ja Tartu vahel. Et hiljem ei ole seda tüve enam tuvastatud, siis võib arvata, et see on tänaseks välja surnud. Teist - Genotype II (CVR 1- SNP1) on aga leitud 2016. ja 2017. aastal Läänemaalt, Pärnumaalt ja Harjumaalt. Võttes aluseks ajalist järjestust viimati nimetatud tüve avastamisel võib oletada, et mutatsioon tekkis esmalt Läänemaal, kust see levis esmalt Pärnumale ja siis Harjumaa suunas. See viirustüvi on põhjustanud ka ühe haiguspuhangu koduseafarmis Pärnumaal. Et sama tüvi levis samas piirkonnas metssigadel, siis kinnitab see hüpoteesi, et viiruse ülekande kodusigadele on toimunud vahetult ümbritsevast keskkonnast.

Soovitused ja ettepanekud:

Uuringu tulemused kinnitavad, et nakatunud metssigade korjustel on oluline roll nakkuse levikul metsseapopulatsioonides ja nende kiire eemaldamine loodusest on oluline meede nakkuse leviku tõkestamisel.

Samuti kinnitavad uuringu tulemused, et nakatunud metssigade korjustest pärinev SAK viirus püsib pinnases tõenäoliselt nakkusvõimelisena pikka aega. Seeläbi on pinnas oluliseks nakkuse allikaks ning nakkuse ülekanderiskide vähendamiseks on vaja tõhustada bioturvalisuse meetmeid. Seejuures on oluline kehtestada nõue pesta (soovitavalt ka desinfitseerida) metsatehnikat, mida veetakse ühest piirkonnast teise treileritel, enne kui see viiakse välja nakatunud piirkonnast.