



1. Valutazione del rischio per la dermatite nodulare contagiosa e la peste suina africana

La dermatite nodulare contagiosa [Lumpy Skin Disease o LSD] nei bovini e la peste suina africana [African Swine Fever o PSA] nei suini sono entrambe malattie animali virali a diffusione internazionale che danneggiano il settore zootecnico in Europa. La LSD provoca ferite cutanee nodulari, febbre, patologia potenzialmente generalizzata e il decesso in alcuni dei bovini esposti. La PSA determina una grave malattia nei suini, che induce febbre, lesioni emorragiche e decesso rapido della maggior parte dei suidi infetti, compresi i cinghiali. Malgrado i virus della LSD e della PSA non siano trasmissibili agli esseri umani, le possibilità di controllo per entrambe le malattie negli animali rimangono limitate. Pertanto, l'identificazione e la riduzione dei fattori di rischio associati ai virus LSD e PSA sono fondamentali per la prevenzione delle malattie.

Nell'ambito del progetto EU Horizon 2020 DEFEND, l'Istituto federale di ricerca tedesco per la salute animale (Friedrich-Loeffler-Institut) guida il pacchetto di lavoro 1 [WP1] per sviluppare un quadro di valutazione del rischio per i virus LSD e PSA. In una prima fase, il WP1 ha raccolto un ampio spettro di potenziali fattori di rischio effettuando una ricerca sistematica nei database della letteratura scientifica. Gli scienziati hanno scoperto fattori di rischio correlati ad entrambe le malattie: virus, ambiente, biosicurezza, allevamento, trasporto, rete, società, sorveglianza e fattori di rischio correlati alla risposta alla malattia; specificatamente per LSD sono stati individuati fattori correlati agli artropodi, alla razza allevata, alla movimentazione del bestiame e di insetti, così come specificatamente per il virus della PSA fattori legati alla razza suina, alla movimentazione dei capi dei prodotti suini e alla gestione della fauna selvatica.

L'insieme dei potenziali fattori di rischio individuati guiderà le strategie di controllo e prevenzione per i virus della LSD e della PSA.

2. Oltre i confini: il ruolo dei conflitti e dell'insicurezza nella diffusione delle malattie animali

Negli ultimi 5 anni l'UE e i paesi limitrofi hanno registrato focolai di molte malattie animali, tra cui la dermatite nodulare contagiosa (LSD) e la peste suina africana (PSA). La progressione di queste

malattie potrebbe essere stata facilitata dalla guerra o dai disordini civili. Il gruppo di lavoro DEFEND 3 "Conflitto, migrazione e diffusione del virus" sta studiando se e come le guerre civili, l'insicurezza, i conflitti e le migrazioni umane possano agire come fattori che determinano l'insorgenza e la diffusione delle malattie animali. Un'attenzione particolare è rivolta alla LSD e alla PSA e vengono prese in considerazione anche altre malattie animali, tra cui l'fta epizootica e la peste dei piccoli ruminanti.

Gli obiettivi della ricerca sono:

- generare dati/conoscenze affidabili e coerenti su come le rotte e le dinamiche migratorie umane e animali sono influenzate da conflitti, insicurezza e disordini
- identificare i fattori di rischio per la diffusione di malattie animali legate ai cambiamenti nella mobilità e nei modelli commerciali associati ai conflitti
- adattare ed esaminare la metodologia per la raccolta dei dati sull'emergenza e la diffusione delle malattie nelle aree di conflitto

I dati relativi alla migrazione umana e degli animali domestici saranno raccolti utilizzando indagini e strumenti metodologici partecipativi, come la Participatory Rural Appraisals e l'epidemiologia partecipativa, basati su discussioni di gruppo, interviste a informatori chiave, mappe partecipative e visite sul campo di punti strategici. I dati raccolti saranno uniti ai dati ufficiali dei sistemi di notifica delle malattie degli animali (Animal Disease Notification Systems, o ADNS) e ai dati migratori ottenuti dalle piattaforme di migrazione (IOM, UNDESA, IDMC, UNHCR ecc.).

Le attività si concentreranno su tre macro-aree: i) zone di confine in Medio Oriente-Siria/Turchia e Siria/Libano; ii) zone di confine nella regione balcanica; iii) zone di confine tra Ucraina, Romania, Moldavia e Ungheria

3. Prevenzione e gestione della peste suina africana

L'attività si concentra sui fattori di rischio associati alla trasmissione della peste suina africana (PSA) a livello di allevamento. Il risultato dell'attività è stato raggiunto grazie a un'ampia revisione della letteratura sui fattori epidemiologici rilevanti per la diffusione della PSA nei suini e nei cinghiali a contatto con i suini.

La PSA è un virus altamente virulento e altamente resistente che colpisce sia i suini che i cinghiali.

Esaminando la letteratura più recente relativa alla diffusione della PSA nei Paesi dell'Europa orientale e in Belgio, sono stati individuati fattori di rischio critici per la trasmissione della malattia a livello di allevamento, così riassunti:

- Movimenti di animali (contatto diretto suino a suino). Presenza di cinghiali infetti che possono trasmettere il virus in natura e ai suini. I contatti tra cinghiali e suini sono un importante fattore di rischio nei sistemi di allevamento libero, e nel settore dell'allevamento da cortile. Gli animali deceduti rimangono contagiosi per un lungo periodo.
- Il trasporto del virus su fomite, indumenti e calzature è un fattore di rischio associato alle attività di cacciatori, raccoglitori di funghi e bacche, veterinari e para-veterinari, movimenti di veicoli da e per l'allevamento, nonché vicinanza a un macello o a una discarica.

- Nel settore dell'allevamento da cortile i principali fattori di rischio sono indotti dall'uomo: basse misure di biosicurezza, movimenti illegali di suini infetti, alimentazione con scarti e sottostima associati a "vendite di emergenza" di suini infetti.

Al fine di mitigare i suddetti fattori di rischio è imperativo migliorare le misure generali di biosicurezza nei siti di allevamento, mettere sotto controllo i sistemi di allevamento libero, vietare l'alimentazione con residui nonché promuovere la preparazione degli allevatori e dei tecnici rispetto a tutte le necessarie misure precauzionali da adottare per proteggere la propria mandria dalla trasmissione della PSA.

4. Migliorare gli strumenti di ricerca per lo studio degli anticorpi neutralizzanti contro il virus della dermatite nodulare contagiosa.

La dermatite nodulare contagiosa (LSD) è una malattia transfrontaliera, globale ed emergente di grande importanza economica. L'agente eziologico, il virus della dermatite nodulare contagiosa (LSDV), infetta il bestiame causando una malattia sistemica che può portare a sostanziali perdite di produzione. Sono necessari strumenti di laboratorio migliori per sviluppare vaccini e strumenti diagnostici più efficaci.

Sono disponibili linee cellulari limitate per la propagazione della LSDV, il che influisce sui successivi sforzi di ricerca. Nell'ambito del progetto Horizon 2020 DEFEND abbiamo utilizzato una linea cellulare specifica per l'ospite, le cellule Madin-Darby (MDBK) del rene bovino. È stato dimostrato che le cellule MDBK sono sensibili all'infezione da LSDV e formano placche distinte di tipo focolaio.

Da questi risultati, siamo stati in grado di sviluppare un test di virus neutralizzazione a immunofluorescenza (IFVNT) per il rilevamento e la quantificazione degli anticorpi neutralizzanti il LSDV (nAb), un componente chiave dell'immunità protettiva al LSDV. Utilizzando il siero di bovini infettati sperimentalmente da LSDV dopo averlo marcato con un anticorpo secondario fluorescente, il test è stato in grado di rilevare con precisione i nAb in animali infetti e non infetti. La visualizzazione dei focolai fluorescenti ha migliorato la sensibilità del test, rendendo più semplice l'interpretazione dei risultati e la semi-quantificazione dei nAb nei bovini per tutta la durata dello studio.

Il miglioramento dei test per il rilevamento dei nAb è essenziale per valutare l'efficacia del vaccino contro l'LSDV. I metodi descritti dalla nostra ricerca forniscono strumenti aggiuntivi per questo scopo e possono essere implementati nei laboratori di ricerca sull'LSDV. Nel complesso, questi strumenti contribuiscono ai programmi di controllo e prevenzione della LSD.

5. Una revisione dei fattori di rischio dell'incursione della peste suina africana nell'allevamento di suini nel contesto dell'Unione europea

Negli ultimi dieci anni la peste suina africana (PSA) è uscita dalla sua area originaria di endemicità e si è diffusa ampiamente in Europa e in Asia. Questa evoluzione della PSA ha causato gravi danni economici ai paesi colpiti, rimodellando il settore dell'allevamento suinicolo e la rete commerciale di

suini in tutto il mondo. Abbiamo effettuato una revisione della letteratura per identificare i fattori di rischio associati all'introduzione della PSA negli allevamenti.

I fattori di rischio più critici sono:

1. Misure basse di biosicurezza nei sistemi agricoli commerciali, non commerciali e all'aperto
2. I sistemi di allevamento libero o all'aperto sono considerati, di per sé, criticamente rischiosi
3. Contatto con suini infetti acquistati da zone infette
4. Contatto con cinghiali, maiali di allevamento libero o maiali di altri allevamenti
5. Alimentazione con avanzi di cucina o mangimi da fornitori non affidabili
6. Contatto con fomite contaminati comprese le calzature o gli indumenti dell'allevatore, dei cacciatori, dei veterinari e dei para-veterinari
7. Mancata segnalazione di animali sintomatici o macellazione illegale di emergenza in allevamento

Poiché non è disponibile alcun vaccino o alcuna terapia efficace per la PSA, tutte le parti interessate dovrebbero adattare le proprie pratiche di gestione e in particolare le proprie misure di biosicurezza per evitare di esporre i propri allevamenti a questi rischi critici.

6. Stima del rischio di contaminazione ambientale da parte degli utilizzatori delle foreste nelle aree endemiche della peste suina africana

La peste suina africana (PSA) colpisce diverse specie di suidi selvatici e domestici, ed è sia una preoccupazione ecologica che economica, che causa grandi perdite economiche dirette e indirette all'industria suinicola. Il virus può sopravvivere per lunghi periodi nell'ambiente e gli esseri umani possono agire involontariamente come vettori attraverso fomiticontaminati, contribuendo così alla diffusione della malattia. Per valutare l'entità di questo problema, abbiamo condotto uno studio di simulazione, in cui abbiamo stimato la probabilità di contaminazione da PSA correlata a diversi tipi di attività forestali umane.

Il nostro studio ha rivelato che la contaminazione ambientale da PSA è un evento piuttosto improbabile. Ampliando il processo di contaminazione a un anno intero e a vaste aree geografiche, tuttavia, l'accumulo delle stesse attività forestali nel tempo e nello spazio ha prodotto la previsione del verificarsi di migliaia di eventi di contaminazione ogni anno. La caccia e l'alimentazione supplementare dei cinghiali sono emerse come le attività più rischiose in termini di probabilità di contaminazione.

Quando si pianificano azioni di gestione per ridurre la circolazione della PSA, il rischio di contaminazione ambientale non deve essere trascurato. Nelle aree affette da PSA, l'alimentazione supplementare dovrebbe essere fortemente ridotta o evitata. La caccia al cinghiale come strumento di gestione e sorveglianza dovrebbe essere attentamente valutata, considerando sia i suoi benefici che i rischi di contaminazione associati. Nelle aree endemiche della PSA, è essenziale migliorare e applicare rigorose misure di biosicurezza per tutte le attività umane basate sulle foreste.

7. Risposta immunitaria alla sfida sperimentale con LSDV

Il virus della dermatite nodulare contagiosa (LSDV) causa gravi malattie nei bovini e nei bufali d'acqua ed è trasmesso da vettori artropodi ematofagi. Lo sviluppo di strumenti per controllare la malattia è ostacolato dalla scarsità di informazioni sulla risposta immunitaria all'LSDV.

In via sperimentale, abbiamo inoculato dei vitelli con LSDV tramite inoculazione con ago o inoculazione con artropodi utilizzando come vettori *Stomoxys calcitrans* e *Aedes aegypti* positivi al virus. Sette su diciassette vitelli inoculati con ago (41%) e 8/10 (80%) dei vitelli inoculati con artropodi hanno sviluppato una malattia clinica, definita come sviluppo di lesioni cutanee multiple.

Abbiamo trovato una risposta immunitaria cellulo-mediata (CMI) specifica per l'LSDV variabile nei vitelli inoculati con ago, non distinguibile tra vitelli con sintomatologia clinica e senza. Tuttavia, la risposta CMI nei vitelli inoculati con artropodi era molto coerente con una chiara differenza tra bovini clinici (risposta CMI forte) e non clinici (risposta CMI debole).

In tutti i bovini inoculati sono stati rilevati anticorpi neutralizzanti contro l'LSDV a partire da 5-7 giorni post-infezione. Una forte risposta IgM nei vitelli senza sintomatologia clinica inoculati con artropodi ha suggerito che si tratti di un correlato di protezione.

Questo studio rivela le differenze nella risposta immunitaria tra bovini LSD con sintomatologia clinica e senza e sottolinea l'importanza di utilizzare un modello di trasmissione adatto. Fornisce inoltre dettagli immunologici fondamentali per guidare lo sviluppo di nuovi test diagnostici e vaccini migliori per la LSD.

8. Risposte immunitarie cellulari e umorali dopo l'immunizzazione

Il virus della peste suina africana (PSA) provoca una malattia emorragica letale nei suini e nei cinghiali, per i quali non esiste attualmente un vaccino autorizzato nell'UE. I vaccini sperimentali contro la peste suina africana possono essere indicativamente suddivisi in vaccini vivi attenuati, che sono versioni indebolite del virus fatale, o vaccini a sub-unità simili a quelli sviluppati per il COVID. Il virus della peste suina africana è un patogeno complesso che codifica per più di 150 geni e la nostra conoscenza della risposta immunitaria protettiva contro il virus è limitata. Ciò rende tecnicamente impegnativa la selezione del gene o della combinazione di geni da includere in un vaccino a sub-unità.

In via sperimentale, abbiamo inoculato dei suini con un ceppo vivo attenuato del virus della peste suina africana e poi li abbiamo sollecitati tre settimane dopo con un isolato del virus normalmente letale. Abbiamo misurato le risposte immunitarie al virus per l'intera durata degli studi. Molti dei suini sono sopravvissuti all'infezione sperimentale e abbiamo scoperto che hanno prodotto sia anticorpi che risposte immunitarie cellulo-mediate al virus. Nei suini allevati all'aperto, è stata evidenziata una maggiore capacità delle cellule T CD8 (ovvero un tipo di cellule immunitarie in grado di rilevare e attaccare le cellule infette dal virus), di proteggere l'ospite dopo l'infezione con il virus letale di PSA.

Le analisi immunitarie sviluppate per questi studi, in combinazione con i campioni raccolti dagli animali, saranno ora utilizzate per vagliare gli oltre 150 geni del virus della peste suina africana al fine di identificare proteine virali potenzialmente protettive. Queste saranno incorporate nei vaccini a sub-unità e il loro potenziale di proteggere i suini dalle malattie verrà analizzato.

9. Cosa può dirci la diffusione della peste suina africana

La peste suina africana (PSA) è una grave malattia virale dei suidi domestici e selvatici che provoca la morte nella maggior parte dei suini infetti e ha un enorme impatto socioeconomico e sul benessere degli animali. Per controllare la malattia, è importante capire e anticipare come si diffonde. In qualità di leader del pacchetto di lavoro 1 nel progetto EU Horizon 2020 DEFEND, il Friedrich-Loeffler-Institute, l'Istituto federale di ricerca tedesco per la salute animale, ha recentemente sviluppato un nuovo approccio di valutazione del rischio per la PSA per aiutare ad anticiparne la diffusione tra i cinghiali europei.

Poiché non ci sono informazioni dirette sui dettagli della diffusione della PSA nelle popolazioni di cinghiali, gli epidemiologi del WP1 lo hanno stimato indirettamente: i ricercatori sapevano infatti la distanza tra un caso di PSA rilevato e il successivo e quanto tempo normalmente intercorresse tra i due casi. Sulla base di queste informazioni, hanno simulato la diffusione di successivi focolai epidemici di PSA, ipotizzando che il modello di diffusione precoce della malattia somigliasse matematicamente al ben descritto processo di diffusione (moto browniano). Gli epidemiologi hanno quindi usato delle misure statistiche derivate dal loro modello per trarre conclusioni sulla velocità di diffusione della malattia e sull'area colpita dalla PSA in vari momenti dopo l'introduzione della malattia in una popolazione di cinghiali precedentemente non colpita.

Entrambe le stime, ovvero la velocità di diffusione e l'area interessata dalla PSA, sono misure chiave per prevedere come essa si diffonde. Possono aiutare a rispondere in modo appropriato, per controllare la malattia o almeno per minimizzarne i danni.



This project has received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No 773701