



## 1. Okvir za procjenu rizika od bolesti kvrgave kože i afričke kuge svinja

Bolest kvrgave kože [LSD] kod goveda i afrička kuga svinja [AKS] kod svinja su virusne bolesti životinja koje se šire na međunarodnom nivou i nanose štetu stočarskoj proizvodnji u Evropi. LSD izaziva pojavu nodularnih lezija na koži, povišenu temperaturu, a može izazvati i generalizovano oboljenje i smrt kod jednog broja izloženih životinja. AKS izaziva teško oboljenje kod svinja, dovodi do povišene temperature, propustljivosti krvnih sudova i brzog uginuća većine zaraženih svinja, uključujući divlje svinje. Virus LSD i ASK ne uzrokuju bolest kod ljudi, ali su mogućnosti suzbijanja obje bolesti kod životinja ograničene. Stoga je identifikacija i minimiziranje faktora rizika povezanih sa LSD-om i AKS-om od ključne važnosti za prevenciju bolesti.

Kao dio projekta EU Horizon 2020 DEFEND, njemački savezni istraživački institut za zdravlje životinja (Friedrich-Loeffler-Institut) vodi radni paket 1 [WP1] s ciljem razvoja okvira za procjenu rizika za LSD i AKS. U prvom koraku, WP1 je prikupio širok spektar potencijalnih faktora rizika putem sistematskog pretraživanja baza podataka naučne literature. Naučnici su identifikovali faktore rizika koji se odnose na viruse, životnu sredinu, biosigurnost, uzgoj, transport, mreže, društvo, nadzor i odgovor na obje bolesti, kretanje artropoda, rasa goveda, stoke i insekata koji su specifični za LSD, a za AKS faktore vezane za rase svinja, kretanje svinja i svinjskih proizvoda, kao i one koji se odnose na upravljanje divljim životinjama.

Identifikovani portfolio potencijalnih faktora rizika koristiće se za usmjeravanje strategija suzbijanja i prevencije LSD i AKS.

## 2. Izvan granica: uloga sukoba i nestabilnosti u širenju bolesti životinja

Epidemije mnogih bolesti životinja, uključujući bolest kvrgave kože (LSD) i afričku kugu svinja (AKS), pojavile su se u Evropskoj uniji i susjednim zemljama u posljednjih pet godina. Napredovanju ovih bolesti vjerovatno su doprinijeli ratovi odnosno građanski nemiri. DEFEND Radni paket 3 „Sukob, migracija i širenje virusa“ ispituje da li i kako građanski ratovi, nestabilnost, sukobi i migracija ljudi djeluju kao pokretači pojave i širenja bolesti životinja. Posebna pažnja je posvećena LSD-u i ASK-u, a razmatraju se i druge bolesti životinja, uključujući slinavku i šap i kugu malih preživara.

Ciljevi istraživanja su sljedeći:

- generisanje pouzdanih i konzistentnih podataka/saznanja o tome kako sukobi, nesigurnost i nemiri utiču na rute i dinamiku migracije ljudi i životinja;

- identifikacija faktora rizika za širenje bolesti životinja povezanih sa promjenama u mobilnosti i obrascima trgovine izazvane sukobima;
- namjenska izrada i testiranje metodologije za prikupljanje podataka o pojavi i širenju bolesti u konfliktnim područjima;

Podaci koji se odnose na migraciju ljudi i domaćih životinja će se prikupljati putem anketa i participativnih metodoloških alata, kao što su participativne ruralne procjene i participativna epidemiologija koje se zasnivaju na diskusijama u fokus grupama, intervjuima sa ključnim informatorima, participativnim mapama i terenskim inspekcijama strateških tačaka. Prikupljeni podaci biće objedinjeni sa zvaničnim podacima iz sistema za obavještanje o bolestima životinja (ADNS) i podacima o migracijama dobijenim sa platformi za migracije (IOM, UNDESA, IDMC, UNHCR itd.).

Aktivnosti će se fokusirati na tri makro oblasti: i) granična područja na Bliskom istoku – Sirija/Turska i Sirija/Liban; ii) granična područja u reguonu Balkana; iii) granična područja između Ukrajine, Rumunije, Moldavije i Mađarske.

### **3. Prevencija i upravljanje afričkom kugom svinja**

Ovaj zadatak fokusira se na faktore rizika koji su povezani sa širenjem afričke kuge svinja (AKS) na nivou gazdinstva. Ishod zadatka postiže se opsežnim pregledom literature o epidemiološkim pokretačima od značaja za širenje AKS kod domaćih svinja i kod divljih svinja u kontaktu sa domaćim svinjama.

Virus afričke kuge svinja (ASFV) je visoko virulentan, vrlo otporan virus koji pogađa kako domaće tako i divlje svinje.

Pretražujući najnoviju literaturu o širenju virusa ASK u istočnoevropske zemlje i Belgiju, identifikovali smo ključne faktore rizika za prenošenje bolesti na nivou gazdinstva, koji su sumirani kako slijedi:

- Kretanje životinja (direktan kontakt između svinja). Prisustvo zaraženih divljih svinja koje mogu prenijeti virus u divljini i na domaće svinje. Kontakt između divljih i domaćih svinja glavni su faktor rizika u sistemima slobodnog uzgoja i u sektoru dvorišnog uzgoja. Mrtve životinje ostaju zarazne dugo vremena.
- Prenošnje virusa predmetima, odjećom i obućom predstavlja faktor rizika povezan s aktivnostima lovaca, berača gljiva i bobičastog voća, veterinaru i veterinarskih pomoćnika, kretanjem vozila od i do gazdinstava, kao i blizinom klanica ili deponija otpada.
- U sektoru dvorišnog uzgoja glavne faktore rizika uzrokuje čovjek: niske mjere biosigurnosti, nelegalni transport zaraženih svinja, hranjenje pomijama i nedovoljno prijavljivanje povezano sa „hitnom prodajom“ zaraženih svinja.

Da bi se ublažili gore navedeni faktori rizika, nužno je poboljšati opšte biosigurnosne mjere na gazdinstvima, staviti pod kontrolu sisteme slobodnog uzgoja, zabraniti hranjenje pomijama, i unaprijediti nivo spremnosti poljoprivrednika i tehničara za preduzimanje svih neophodnih mjera predostrožnosti za zaštitu svojih stada od prenošenja AKS.

## **4. Unapređenje istraživačkih alata za proučavanje neutralizujućih antitijela na virus bolesti kvrgave kože**

Bolest kvrgave kože (LSD) je nova, globalna prekogranična bolest od ekonomskog značaja. Uzročnik, virus nodularnog dermatitisa (LSDV), inficira životinje uzrokujući sistemsku bolest koja može dovesti do značajnih gubitaka u proizvodnji. Za razvoj boljih vakcina i dijagnostičkih alata potrebni su unaprijeđeni laboratorijski alati.

Dostupne ćelijske linije za propagaciju LSDV su ograničene, što utiče na dalja istraživanja. Kao dio projekta Horizon 2020 DEFEND, koristili smo ćelijsku liniju specifičnu za domaćina, ćelije goveđeg bubrega Madin-Darbi (MDBK). Pokazalo se da su MDBK ćelije prihvatljive za LSDV infekciju formiranjem jasnih žarišnih plakova.

Korišćenjem seruma goveda eksperimentalno zaraženih virusom bolesti kvrgave kože i obilježavanja fluorescentnim sekundarnim antitijelom, test je mogao precizno da detektuje nAbs kod inficiranih i neinficiranih životinja. Korišćenjem seruma goveda eksperimentalno zaraženih virusom bolesti kvrgave kože i obilježenih fluorescentnim sekundarnim antitijelom, test je bio u stanju da precizno detektuje nAbs kod inficiranih i neinficiranih životinja. Vizuelizacija fluorescentnih žarišta poboljšala je osjetljivost testa, što je olakšalo tumačenje rezultata i polukvantifikaciju nAbs-a kod goveda tokom perioda istraživanja.

Poboljšanje testova za detekciju neutralizirajućih antijela je od suštinskog značaja za procjenu efikasnosti vakcine protiv LSDV-a. Metode opisane u našem istraživanju pružaju dodatne alate za ovu svrhu i mogu se primijeniti u laboratorijama koje se bave istraživanjem virusa bolesti kvrgave kože. Ovi alati generalno doprinose programima suzbijanja i prevencije LSD.

## **5. Pregled faktora rizika od pojave afričke kuge svinja u svinjogojstvu u kontekstu Evropske unije**

Tokom protekle decenije afrička kuga svinja značajno se proširila u Evropi i Aziji izvan svog izvornog endemičnog područja. Ova evolucija afričke kuge svinja prouzrokovala je ozbiljnu ekonomsku štetu pogođenim zemljama, utičući na promjene u svinjogojstvu i mreži trgovine svinjskim mesom širom svijeta. Izvršili smo pregled literature kako bismo identifikovali faktore rizika povezane sa unošenjem AKS na gazdinstva.

Najkritičniji faktori rizika bili su:

1. Niske biosigurnosne mjere za sisteme komercijalnog i nekomercijalnog uzgoja, i sisteme uzgoja na otvorenom
2. Sistemi slobodnog uzgoja ili uzgoja na otvorenom smatraju se, sami po sebi, kritičnim rizicima
3. Kontakt sa zaraženim svinjama kupljenim iz zaraženih područja
4. Kontakt sa divljim svinjama, svinjama iz slobodnog uzgoja ili svinjama sa drugih farmi
5. Ishrana ostacima hrane ili stočnom hranom nabavljenom od nepouzdanih prodavaca
6. Kontakt s kontaminiranim predmetima, uključujući obuću ili odjeću poljoprivrednika, lovaca, veterinaru i veterinarskih pomoćnika

7. Neprijavlivanje životinja kod kojih su se pojavili simptomi bolesti ili nelegalno hitno klanje na gazdinstvu

Budući da ne postoji efikasna vakcina ili terapija za AKS, svi akteri treba da prilagode svoje prakse upravljanja, a naročito svoje biosigurnosne mjere kako bi izbjegli izlaganje svojih gazdinstava navedenim kritičnim rizicima.

## **6. Procjena rizika od kontaminacije životne sredine od strane korisnika šuma u endemskim područjima afričke kuge svinja**

Afrička kuga svinja (AKS) predstavlja istovremeno i ekološki i ekonomski problem jer pogađa različite vrste divljih i domaćih svinja, što izaziva velike neposredne i posredne ekonomske gubitke sektoru svinjogojstva. Virus može dugo da preživi u životnoj sredini, a ljudi mogu nenamjerno da djeluju kao vektori putem zaraženih predmeta, doprinoseći širenju bolesti. Da bismo procijenili ozbiljnost ovog problema, sprovedi smo studiju simulacije, u kojoj smo procijenili vjerovatnoću kontaminacije AKS-om povezane s različitim vrstama aktivnosti ljudi u šumama.

Naša studija je pokazala da je vjerovatnoća kontaminacije životne sredine AKS-om mala. Međutim, kada se proces kontaminacije posmatra s aspekta cijele godine i velikih geografskih područja, akumulacija istih šumskih aktivnosti u vremenu i prostoru dovodi do očekivanja pojave više hiljada događaja kontaminacije svake godine. Prihranjivanje i lov na divlje svinje pokazali su se kao najrizičnije aktivnosti u pogledu vjerovatnoće kontaminacije.

Rizik od kontaminacije životne sredine AKS-om ne smije se zanemariti prilikom planiranja mjera upravljanja u cilju smanjenja cirkulacije AKS-a. U područjima zahvaćenim AKS-om, treba znatno smanjiti ili izbjegavati prihranjivanje. Lov na divlje svinje kao sredstvo upravljanja i nadzora mora se pažljivo procijeniti, uzimajući u obzir i njegove prednosti i povezane rizike od kontaminacije. Neophodno je poboljšati i sprovesti stroge mjere biosigurnosti za sve aktivnosti ljudi u šumama u endemskim područjima AKS-a.

## **7. Imuni odgovor na eksperimentalnu vještačku infekciju LSDV**

Virus bolesti kvrgave kože (LSDV) izaziva teško oboljenje goveda i vodenih bivola i prenosi se vektorima artropoda koji se hrane krvlju. Informacije o imunološkom odgovoru na LSDV su ograničene, što otežava razvoj alata za suzbijanje bolesti.

Izvršili smo eksperimentalnu inokulaciju telad LSDV-om pomoću igle ili inokulacijom preko artropoda koristeći vektore *Stomoxys calcitrans* i *Aedes aegypti* pozitivne na virus. Kliničko oboljenje, definisano kao pojava višestrukih kožnih lezija, razvila se kod 7 od 17 teladi inokulisanih iglama (41%), odnosno kod 8 od 10 (80%) teladi inokulisanih artropodama.

Pronašli smo varijabilni ćelijski posredovan imuni odgovor (CMI) specifičan za virus bolesti kvrgave kože kod teladi inokulisanih iglom, koji se nije razlikovao između kliničke i nekliničke teladi. Međutim, CMI odgovor kod teladi inokulisanih artropodama bio je veoma konzistentan s jasnom razlikom između kliničkih (jak CMI odgovor) i nekliničkih (slab CMI odgovor) goveda.

Neutralizujuća antitijela protiv LSDV-a detektovana su kod svih inokulisanih goveda od 5-7 dpi. Snažan IgM odgovor kod teladi inokulisanih artropodama ukazuje da je ovo korelat zaštite.

Ovom studijom otkrivene su razlike u imunim odgovorima između kliničkih i nekliničkih LSD goveda i naglašava važnost korišćenja odgovarajućeg modela prenosa. Takođe daje ključne imunološke podatke koji će usmjeravati razvoj novih dijagnostičkih testova i poboljšanih vakcina protiv LSD.

## 8. Čelijski i humoralni imuni odgovori nakon imunizacije

Virus afričke svinjske kuge uzrokuje smrtonosnu hemoragijsku bolest kod domaćih svinja i divljih svinja za koje trenutno ne postoji vakcina odobrena za upotrebu u Evropskoj uniji. Eksperimentalne vakcine protiv afričke kuge svinja mogu se okvirno podijeliti na žive atenuirane vakcine, koje su oslabljene verzije smrtonosnog virusa, ili subjedinične vakcine slične onima razvijenim za COVID. Virus afričke kuge svinja je složen patogen koji kodira više od 150 gena, a naše je znanje o zaštitnom imunom odgovoru protiv virusa ograničeno. Zbog toga je izbor gena ili kombinacije gena koji će se uključiti u subjediničnu vakcinu tehnički izazovno.

Izvršili smo eksperimentalnu inokulaciju svinja živim atenuiranim sojem virusa afričke kuge svinja, a zatim smo tri nedjelje kasnije svinje vještački inficirali inače smrtonosnim izolatom virusa. Tokom ispitivanja mjerili smo imune odgovore na virus. Većina svinja preživjela je eksperimentalnu vještačku infekciju i otkrili smo da su svinje proizvele i antitijela i čelijski posredovane imune odgovore na virus. Kod nesrodnih farmskih svinja, sposobnost CD8 T-ćelija - vrsta imunih ćelija koja je sposobna da otkrije i ubije ćelije inficirane virusom - pokazuje najjaču korelaciju sa zaštitom nakon vještačke infekcije smrtonosnim virusom afričke kuge svinja.

Imunotestovi razvijeni za ove studije, u kombinaciji s uzorcima prikupljenim od životinja, koristiće se za skrining više od 150 gena virusa afričke kuge svinja kako bi se identifikovali potencijalno zaštitni virusni proteini. Oni će biti ugrađeni u subjedinične vakcine a njihova sposobnost zaštite svinja od bolesti će se ispitati.

## 9. Šta nam širenje virusa može reći o afričkoj kugi svinja

Afrička kuga svinja (AKS) je ozbiljna virusna bolest domaćih i divljih svinja koja uzrokuje smrt kod većine zaraženih svinja i ima ogroman socioekonomski uticaj i uticaj na dobrobit životinja. Da bi se bolest suzbila važno je razumjeti i predvidjeti kako se ASK širi. Friedrich-Loeffler-Institut, njemački savezni istraživački institut za zdravlje životinja, kao vodeća institucija radnog paketa 1 u sklopu EU projekta Horizon 2020 DEFEND, nedavno je razvio novi pristup procjene rizika za AKS kako bi pomogao u predviđanju širenja bolesti među divljim svinjama u Evropi.

S obzirom da ne postoje neposredne informacije o pojedinostima širenja AKS u populacijama divljih svinja, epidemiolozi iz WP-1 smatraju da se bolest širi posredno: naučnici znaju koliko daleko se jedan otkriveni slučaj afričke kuge svinja obično javlja od narednog i koliko vremena obično prolazi između dva uzastopna slučaja. Ova saznanja su sada iskoristili da generišu veliki broj sličnih fiktivnih obrazaca pojave afričke kuge svinja, uz pretpostavku da početni obrazac širenja bolesti nalikuje dobro opisanom matematičkom procesu difuzije (Braunovo kretanje). Epidemiolozi su zatim koristili statističke mjere izvedene iz svog modela kako bi izveli zaključke o brzini širenja bolesti i području

zahvaćenom AKS-om u različitim vremenskim tačkama nakon ulaska bolesti u prethodno nezahvaćene populacije divljih svinja.

Obje procjene, brzina širenja i područje zahvaćeno AKS-om, ključni su pokazatelji za predviđanje širenja afričke kuge svinja. One mogu pomoći da se na odgovarajući način suzbije bolest ili njene štetne posljedice barem svedu na najmanju moguću mjeru.



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