



## **1. Ramy oceny ryzyka choroby guzowatej skóry bydła i afrykańskiego pomoru świń**

Choroba guzowatej skóry u bydła [LSD] i afrykański pomór świń [ASF] to rozprzestrzeniające się na całym świecie wirusowe choroby zwierząt, które szkodzą bydłu w Europie. LSD powoduje guzki skórne, gorączkę, potencjalnie uogólnioną chorobę i śmierć u części narażonego na chorobę bydła. ASF powoduje ciężką chorobę u świń, prowadzącą do gorączki, nadmiernej przepuszczalności naczyń krwionośnych i szybkiego zgonu większości zakażonych świń, w tym dzików. Podczas gdy wirusy LSD i ASF nie powodują chorób u ludzi, możliwości zwalczania obu chorób u zwierząt są ograniczone. Dlatego identyfikacja i minimalizacja czynników ryzyka związanych z LSD i ASF ma kluczowe znaczenie dla zapobiegania tym chorobom.

W ramach projektu UE Horizon 2020 DEFEND, niemiecki Federalny Instytut Badawczy Zdrowia Zwierząt (Friedrich-Loeffler-Institut) prowadzi pakiet roboczy 1 [WP1] w celu opracowania ram oceny ryzyka dla LSD i ASF. W pierwszym etapie WP1 zebrało szerokie spektrum potencjalnych czynników ryzyka poprzez przeglądy systematyczne baz danych literatury naukowej. Naukowcy znaleźli czynniki ryzyka, które są związane z wirusem, środowiskiem, bezpieczeństwem biologicznym, hodowlą, transportem, siecią, społeczeństwem, nadzorem oraz reakcją na chorobę dla obu chorób, czynniki związane ze stawonogami, rasą bydła, przemieszczaniem się bydła i owadów szczególnie dla LSD, a także czynniki związane z rasą świń, przemieszczaniem się świń i produktów wieprzowych oraz zarządzaniem dzikimi zwierzętami dla ASF.

Zidentyfikowany zestaw potencjalnych czynników ryzyka będzie stanowił wytyczne dla strategii kontroli i zapobiegania LSD i ASF.

## **2. Poza granicami: rola konfliktów i braku bezpieczeństwa w rozprzestrzenianiu się chorób zwierząt**

W ciągu ostatnich 5 lat w UE i krajach sąsiednich wystąpiły ogniska wielu chorób zwierzęcych, w tym choroby guzowatej skóry (LSD) i afrykańskiego pomoru świń (ASF). Rozprzestrzenieniu tych chorób mogły sprzyjać wojny lub niepokoje społeczne. Pakiet roboczy DEFEND 3 „Konflikty, migracja i rozprzestrzenianie się wirusów” bada, czy i jak wojny domowe, brak bezpieczeństwa, konflikty i migracja ludzi działają jako czynniki sprzyjające pojawianiu się i rozprzestrzenianiu chorób zwierząt. Szczególną uwagę poświęca się LSD i ASF, a także innym chorobom zwierzęcym, w tym pryszczycy i pomorowi małych przeżuwaczy.

Cele badań to:

- generowanie solidnych i spójnych danych/wiedzy na temat wpływu konfliktów, braku bezpieczeństwa i niepokoju na rozwój i dynamikę migracji ludzi i zwierząt

- określenie czynników ryzyka rozprzestrzeniania się chorób zwierzęcych związanych z towarzyszącymi konfliktom zmianami w strukturze transportu i handlu
- dostosowanie i testowanie metodologii gromadzenia danych na temat pojawiania się i rozprzestrzeniania chorób na obszarach objętych konfliktem

Dane dotyczące migracji ludzi i zwierząt domowych będą zbierane za pomocą ankiet i narzędzi metodologii partycypacyjnej, takich jak Participatory Rural Appraisals i Epidemiologia Partycypacyjna w oparciu o dyskusje w grupach docelowych, wywiady z kluczowymi informatorami, mapy partycypacyjne i inspekcje terenowe punktów strategicznych. Zebrane dane zostaną połączone z oficjalnymi danymi z systemów zgłaszania chorób zwierząt (ADNS) oraz danymi migracyjnymi uzyskanymi z platform migracyjnych (IOM, UNDESA, IDMC, UNHCR itp.).

Działania skupią się na trzech makroobszarach: i) strefy przygraniczne na Bliskim Wschodzie – Syria/Turcja i Syria/Liban; ii) strefy przygraniczne w regionie Bałkanów; iii) strefy przygraniczne między Ukrainą, Rumunią, Mołdawią i Węgrami

### **3. Zapobieganie afrykańskiemu pomorowi świń oraz zarządzanie nim**

Zadanie koncentruje się na czynnikach ryzyka związanych z przenoszeniem afrykańskiego pomoru świń (ASF) na poziomie gospodarstw rolnych. Efektem realizacji zadania jest obszerny przegląd literatury dotyczący czynników epidemiologicznych istotnych dla rozprzestrzeniania się ASF u świń domowych i dzików na styku ze świniami domowymi.

ASFV jest wysoce zjadliwym, wysoce odpornym wirusem atakującym zarówno świnie domowe, jak również dziki.

Przeszukując najnowszą literaturę dotyczącą rozprzestrzeniania się ASFV w krajach Europy Wschodniej i w Belgii, zidentyfikowaliśmy krytyczne czynniki ryzyka dla przenoszenia choroby na poziomie gospodarstw rolnych, podsumowane w następujący sposób:

- Przemieszczanie się zwierząt (bezpośredni kontakt świnia-świnia). Obecność zakażonych dzików, które mogą przenosić wirusa w środowisku naturalnym i na świnie domowe. Kontakt dzika ze świnia jest głównym czynnikiem ryzyka w systemie wolnowybiegowym chowu trzody chlewnej i w sektorze przydomowym. Martwe zwierzęta pozostają zakażne przez długi czas.
- Przenoszenie wirusa na przedmiotach, odzieży i obuwiu jest czynnikiem ryzyka związanym z działalnością myśliwych, zbieraczy grzybów i jagód, lekarzy weterynarii i paraweterynarzy, ruchem pojazdów z i do gospodarstwa, a także bliskością rzeźni lub wysypiska śmieci.
- W sektorze przydomowym główne czynniki ryzyka wynikają z aktywności człowieka: niewystarczające środki bezpieczeństwa biologicznego, nielegalne przemieszczanie zakażonych świń, karmienie pomyjami i niedostateczna sprawozdawczość związana ze "sprzedażą awaryjną" zakażonych świń.

W celu złagodzenia powyższych czynników ryzyka konieczna jest poprawa ogólnych środków bezpieczeństwa biologicznego w gospodarstwach, wprowadzenie kontroli nad systemami wolnowybiegowymi, zakaz karmienia zwierząt pomyjami, jak również promowanie gotowości rolników i techników w zakresie wszystkich niezbędnych środków ostrożności, które należy podjąć w celu ochrony własnego stada przed przeniesieniem ASFV.

#### **4. Doskonalenie narzędzi badawczych do badania przeciwciał neutralizujących wirusa choroby guzowatej skóry bydła.**

Choroba guzowatej skóry bydła (LSD) to pojawiająca się globalna choroba transgraniczna o znaczeniu gospodarczym. Czynnikiem sprawczym, wirus choroby guzowatej skóry bydła (LSDV), zaraża bydło, powodując chorobę ogólnoustrojową, która może prowadzić do znacznych strat w produkcji. W celu opracowania lepszych szczepionek i narzędzi diagnostycznych konieczne są ulepszone narzędzia laboratoryjne.

Dostępność linii rozmnażania do rozmnażania LSDV jest ograniczona, co ma wpływ na dalsze badania. W ramach projektu Horizon 2020 DEFEND wykorzystaliśmy specyficzną dla gospodarza linię komórkową, komórki nabłonka nerki bydłowej Madin-Darby (MDBK). Wykazano, że komórki MDBK są podatne na infekcję LSDV, tworząc odrębne blaszki typu ogniskowego.

Na podstawie tych wyników udało nam się opracować immunofluorescencyjny test neutralizacji wirusa (IFVNT) do wykrywania i ilościowego oznaczania przeciwciał neutralizujących LSDV (nAbs) – kluczowego składnika odporności ochronnej na LSDV. Używając surowicy od bydła eksperymentalnie zakażonego LSDV i fluorescencyjnych przeciwciał wtórnych, test był w stanie z dużą dokładnością wykryć nAbs u zakażonych i niezakażonych zwierząt. Wizualizacja ognisk fluorescencyjnych poprawiła czułość testu, ułatwiając interpretację wyników i półilościową ocenę nAbs u bydła w całym okresie badania.

Udoskonalenie testów do wykrywania nAbs jest niezbędne do oceny skuteczności szczepionki przeciwko LSDV. Metody, opisane w naszych badaniach, dostarczają dodatkowych narzędzi do tego celu i mogą być wdrożone w całych laboratoriach badawczych LSDV. Generalnie, narzędzia te stanowią wkład w programy kontroli i zapobiegania LSD.

#### **5. Przegląd czynników ryzyka scenariusza pojawienia się afrykańskiego pomoru świń w hodowli trzody chlewnej w Unii Europejskiej**

W ciągu ostatniej dekady afrykański pomór świń (ASF) wydostał się poza swój pierwotny obszar endemiczny i rozprzestrzenił się szeroko w Europie i Azji. Ten rozwój ASF spowodował poważne szkody gospodarcze w krajach dotkniętych chorobą, przekształcając sektor hodowli świń i sieć handlową wieprzowiny na całym świecie. Przeprowadziliśmy przegląd literatury w celu określenia czynników ryzyka związanych z wprowadzeniem ASF do gospodarstw rolnych.

Do najbardziej krytycznych czynników ryzyka należały:

1. Niskie środki bezpieczeństwa biologicznego dla komercyjnych, niekomercyjnych i zewnętrznych systemów rolniczych
2. Systemy chowu na wolnym wybiegu lub na wolnym powietrzu są uważane same w sobie za ryzyko krytyczne
3. Kontakt z zakażonymi świniami zakupionymi w zakażonych obszarach
4. Kontakt z dzikami, świniami z wolnego wybiegu lub świniami z innych gospodarstw
5. Karmienie resztkami kuchennymi, lub paszami od niezaufanych sprzedawców
6. Kontakt ze skażonymi przedmiotami, w tym obuwiem lub odzieżą rolnika, myśliwych, lekarzy weterynarii i para-weterynarzy

## 7. Niezgłaszanie zwierząt z objawami lub nielegalny ubój z konieczności w gospodarstwie

Ponieważ nie jest dostępna skuteczna szczepionka ani terapia przeciwko ASF, wszystkie zainteresowane strony powinny dostosować swoje praktyki zarządzania, a w szczególności środki bezpieczeństwa biologicznego, aby uniknąć narażenia swoich gospodarstw na te krytyczne zagrożenia.

## 6. Oszacowanie ryzyka skażenia środowiska przez użytkowników lasu na obszarach endemicznych dla afrykańskiego pomoru świń

Afrykański pomór świń (ASF) dotyka różne gatunki dzikich i domowych zwierząt świniowatych i jest zarówno problemem ekologicznym, jak i ekonomicznym, który powoduje duże bezpośrednie i pośrednie straty ekonomiczne w przemyśle trzody chlewnej. Wirus może przetrwać przez długi czas w środowisku, a ludzie mogą nieumyślnie pełnić rolę wektorów poprzez zakażone przedmioty, przyczyniając się w ten sposób do rozprzestrzeniania się choroby. Aby ocenić skalę tego problemu, przeprowadziliśmy badanie symulacyjne, w którym oszacowaliśmy prawdopodobieństwo skażenia ASF związane z różnymi rodzajami działalności leśnej człowieka.

Nasze badanie wykazało, że skażenie środowiska ASF jest zdarzeniem raczej mało prawdopodobnym. Kiedy jednak przeskalować proces zanieczyszczania na cały rok i na duże obszary geograficzne, nagromadzenie tych samych działań leśnych w czasie i przestrzeni spowodowało, że można się spodziewać tysięcy zdarzeń zanieczyszczających w każdym roku. Dokarmianie dzików i polowania okazały się najbardziej ryzykownymi czynnościami pod względem prawdopodobieństwa skażenia.

Ryzyko skażenia środowiska przez ASF nie powinno być pomijane przy planowaniu działań zarządczych mających na celu ograniczenie występowania ASF. Na obszarach dotkniętych ASF należy zdecydowanie ograniczyć lub unikać dokarmiania. Polowanie na dziki jako narzędzie zarządzania i nadzoru powinno być dokładnie ocenione, biorąc pod uwagę zarówno płynące z niego korzyści, jak i związane z nim ryzyko skażenia. Niezbędne jest ulepszenie i egzekwowanie ścisłych środków bezpieczeństwa biologicznego dla wszystkich działań człowieka związanych z lasami na obszarach endemicznych ASF.

## 7. Odpowiedź immunologiczna na eksperymentalne zakażenie LSDV

Wirus choroby guzowatej skóry bydła (LSDV) powoduje poważne choroby bydła i bawołów wodnych i jest przenoszony przez żywiące się krwią wektory z kategorii stawonogów. Informacje na temat odpowiedzi immunologicznej na LSDV są ograniczone, co utrudnia opracowanie narzędzi do zwalczania choroby.

Eksperymentalnie zainfekowaliśmy cielęta LSDV przez wektory *Stomoxys calcitrans* i *Aedes aegypti* pozytywne na obecność wirusa. U siedmiu z siedemnastu cieląt zainfekowanych igłą (41%) i 8/10 (80%) cieląt zainfekowanych poprzez wektory stawonogami rozwinęła się choroba kliniczna, zdefiniowana jako rozwój wielu zmian skórnych.

Stwierdziliśmy swoistą odpowiedź immunologiczną typu komórkowego (CMI) specyficzną dla LSDV u cieląt zainfekowanych igłą, która była nie do odróżnienia między cielętami klinicznymi i nieklinicznymi. Jednakże odpowiedź CMI u cieląt zainfekowanych poprzez wektory stawonogami była bardzo spójna z wyraźną różnicą między bydłem z objawami klinicznymi (silna odpowiedź CMI) i bez objawów klinicznych (słaba odpowiedź CMI).

Przeciwciała neutralizujące LSDV wykryto u wszystkich zainfekowanych sztuk bydła w 5-7 dni po infekcji. Silna odpowiedź IgM u nieklinicznych cieląt zainfekowanych poprzez wektory stawonogami sugerowała, że jest to korelat ochrony.

Badanie to ujawnia różnice w odpowiedzi immunologicznej między bydłem otrzymującym LSD w warunkach klinicznych i nieklinicznych oraz podkreśla znaczenie stosowania odpowiedniego modelu transmisji. Dostarcza również fundamentalnych szczegółów immunologicznych, które mogą być podstawą do opracowania nowych testów diagnostycznych i ulepszonych szczepionek dla LSD.

## **8. Komórkowe i humoralne odpowiedzi immunologiczne po immunizacji**

Wirus afrykańskiego pomoru świń powoduje śmiertelną chorobę krwotoczną u świń domowych i dzików, dla której nie ma obecnie szczepionki dopuszczonej do stosowania w UE. Eksperymentalne szczepionki przeciwko afrykańskiemu pomorowi świń można zasadniczo podzielić na żywe szczepionki atenuowane, które są osłabionymi wersjami śmiertelnego wirusa, lub szczepionki podjednostkowe podobne do tych opracowanych dla COVID. Wirus afrykańskiego pomoru świń jest złożonym patogenem, który koduje ponad 150 genów, a nasza wiedza na temat ochronnej odpowiedzi immunologicznej przeciwko wirusowi jest ograniczona. To sprawia, że wybór genu lub kombinacji genów do włączenia do szczepionki podjednostkowej jest technicznym wyzwaniem.

Eksperymentalnie zainfekowaliśmy świnię żywym, atenuowanym szczepem wirusa afrykańskiego pomoru świń, a następnie trzy tygodnie później poddaliśmy je prowokacji normalnie śmiertelnośnym izolatem wirusa. Przez cały czas trwania badań mierzyliśmy odpowiedzi immunologiczne na wirusa. Wiele świń przeżyło wyzwanie eksperymentalne i zanotowaliśmy, że świnię wytwarzają zarówno przeciwciała, jak i komórkową odpowiedź immunologiczną na wirusa. U świń hodowlanych zdolność komórek T CD8, rodzaju komórek odpornościowych zdolnych do wykrywania i zabijania komórek zakażonych wirusem, była najsilniej skorelowana z ochroną po zakażeniu śmiertelnym wirusem afrykańskiego pomoru świń.

Testy immunologiczne opracowane na potrzeby tych badań, w połączeniu z próbkami pobranymi od zwierząt, zostaną teraz wykorzystane do zbadania ponad 150 genów wirusa afrykańskiego pomoru świń w celu zidentyfikowania potencjalnie ochronnych białek wirusowych. Zostaną one włączone do szczepionek podjednostkowych i przetestowane pod kątem ich potencjału ochrony świń przed chorobą.

## **9. Co rozpowszechnienie może nam powiedzieć o afrykańskim pomorze świń**

Afrykański pomór świń (ASF) jest ciężką chorobą wirusową świń domowych i dzikich, która powoduje śmierć większości zakażonych świń i ma ogromny wpływ społeczno-ekonomiczny oraz wpływ na dobrostan zwierząt. Dla kontroli choroby ważne jest zrozumienie i przewidzenie sposobu rozprzestrzeniania się ASF. Jako kierownik pakietu roboczego 1 w projekcie UE Horyzont 2020 DEFEND, Friedrich-Loeffler-Institut, niemiecki Federalny Instytut Badawczy ds. Zdrowia zwierząt, opracował niedawno nowe podejście do oceny ryzyka ASF, aby pomóc przewidywać jego rozprzestrzenianie się wśród europejskich dzików.

Ponieważ nie ma bezpośrednich informacji na temat szczegółów rozprzestrzeniania się ASF w populacjach dzików, epidemiolodzy z WP-1 oszacowali rozprzestrzenianie się choroby w sposób pośredni: Naukowcy wiedzieli, jak daleko jeden wykryty przypadek ASF zwykle występował od

następnego oraz ile czasu zwykle mijało między dwoma kolejnymi przypadkami. Mając tę wiedzę, użyli teraz sztuczki do wygenerowania dużej liczby podobnych fikcyjnych wzorów ognisk ASF, stawiając hipotezę, że wzór wczesnego rozprzestrzeniania się choroby matematycznie przypominał dobrze opisany proces dyfuzji (ruch Browna). Epidemiolodzy wykorzystali następnie miary statystyczne uzyskane z ich modelu do wyciągnięcia wniosków na temat szybkości rozprzestrzeniania się choroby i obszaru dotkniętego ASF w różnych punktach czasowych po pojawieniu się choroby w uprzednio nie dotkniętej populacji dzików.

Oba szacunki, szybkość rozprzestrzeniania się i obszar dotknięty ASF, są kluczowymi metrykami do przewidywania, jak rozprzestrzenia się ASF. Mogą one pomóc w odpowiednim reagowaniu w celu opanowania choroby lub przynajmniej zminimalizowania jej szkód.



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