



# Minister Rolnictwa i Rozwoju Wsi

---

Warszawa, 27 czerwca 2023 r.  
znak sprawy: DŻW.zch.870.65.2023

Pan  
Wiktor Szmulewicz  
Prezes Krajowej Rady Izb Rolniczych  
ul. Przyszłości 5  
05-804 Pruszków  
e-mail: sekretariat@krir.pl

**Dotyczy: Prowadzenia badań nad szczepionką przeciwko afrykańskiemu pomorowi świń.**

Szanowny Panie Prezesie,

W odpowiedzi na pismo z dnia 1 czerwca 2023 r. znak: KRIR/JM/646.2023 w sprawie prowadzenia badań nad szczepionką przeciwko afrykańskiemu pomorowi świń informuję, co następuje.

Prace nad szczepionką przeciwko afrykańskiemu pomorowi świń (ASF) są prowadzone w Państwowym Instytucie Weterynaryjnym - Państwowym Instytucie Badawczym w Puławach od 2017 r.

W latach 2017-2020 w ramach projektu NCN: „Konstrukcja rekombinowanego szczepu wirusa afrykańskiego pomoru świń (ASFV) przy użyciu techniki CRISPR/Cas9” prowadzone były badania mające na celu uzyskanie i zbadanie właściwości biologicznych rekombinowanego szczepu ASFV pozbawionego genów A238L, EP402R i 9GL.

W ramach podjętych w PIWet-PIB badań zastosowano innowacyjną technikę CRISPR/Cas9 (regularnie zgrupowanych i oddzielonych krótkich sekwencji

palindromowych), stanowiącą obecnie najbardziej nowoczesne narzędzie inżynierii genetycznej.

W ramach tego działania prowadzono serie pasażu wraz z manipulacją medium odżywczym w celu uwrażliwienia komórek linii ciągłej na infekcję wirusa. Manipulacjom i sprawdzeniu podlegały linie komórkowe takie jak: VERO, IPAM, COS-1, MARC-145. Ze względu na wyniki prób adaptacji, transfekcję prowadzono na pierwotnej linii komórkowej makrofagów płucnych świń (PPAM) dla której uzyskano najlepsze wskaźniki replikacji wirusa.

Po pomyślnie przeprowadzonej transfekcji hodowle komórkowe selekcjonowano z użyciem puromycyny i zakażano szczepem terenowym Poll8\_28298\_OIII. Wybrane hodowle komórkowe poddano sprawdzeniu z użyciem konwencjonalnej techniki PCR. Na tym etapie wykluczono możliwość mutacji dotyczącej genu A238L - otrzymano produkty reakcji PCR dla tego genu.

Właściwości rekombinowanego szczepu ASFV zostały zbadane in vitro w hodowlach komórek makrofagów płucnych (PPAM) i izolowanych leukocytach świń. Rekombinowany wirus zachował zdolność do namnażania się w zakażonych komórkach hodowli z taką samą dynamiką, jak wirus macierzysty użyty do badań.

W końcowym etapie projektu przeprowadzono badania z użyciem 30 świń o znanym statusie immunologicznym. W maju 2019 roku rozpoczęto doświadczenie z użyciem 14 świń, w wieku 5 tygodni, które podzielono na 2 grupy. Osiem świń z grupy badanej zakażono donosowo zjadliwym szczepem terenowym. Grupę kontrolną (niezakażoną) stanowiło 6 świń.

Bardzo interesujący jest fakt wyraźnie zwiększonej serokonwersji w grupach „szczepionych” szczepem rekombinowanym ASFV. Taki wynik może być następstwem zarówno zmian we właściwościach wirusa wywołanych np. poprzez manipulacje genetyczne, jak również może być wynikiem zmienności osobniczej i predyspozycji genetycznych świń. Wskaźniki śmiertelności nie pozostawiają wątpliwości jednak, że wywołana odpowiedź immunologiczna wśród grup „szczepionych” wirusem rekombinowanym nie ma istotnego wpływu na przeżywalność świń.

Przyczyną tego zjawiska jest brak wytwarzanych po zakażeniu ASFV przeciwciał neutralizujących. Wysoka śmiertelność mimo obecności przeciwciał jest głównym problemem w badaniach nad szczepionką przeciw ASFV. Ponadto stwierdzony brak odporności u „szczepionych” świń w takich przypadkach można tłumaczyć poprzez prawdopodobny brak immunologicznej odpowiedzi komórkowej z udziałem cytotoksycznych limfocytów TCD8+, podczas gdy obserwowane przeciwciała stanowią tylko indykatory zakażenia niezdolne do neutralizacji wirusa.

Równolegle do prowadzonych badań zespół KLR ds. ASF prowadził poszukiwania szczepów naturalnie atenuowanych, mogących stanowić potencjalny materiał szczepionkowy.

W 2017 roku zespół KLR ds. ASF zidentyfikował 5 unikalnych mutacji dotyczących genów MGF 110-7L, MGF 505-5R, K145R, I267L oraz DP60R. Z czego 1 mutacja była cicha a pozostałe zmieniały sekwencje aminokwasowe mogące mieć wpływ na wirulencję patogenu. Jak pokazały późniejsze badania kliniczne - mutacje te pozostały bez wpływu na przebieg ASF u zakażonych świń.

W latach 2019-2021 w ramach dofinansowania z Ministerstwa Rolnictwa - temat S/932: „Zwiększenie potencjału naukowo-badawczego PIWet-PIB w celu opracowania szczepionki ASF” równolegle kontynuowano poszukiwanie szczepów naturalnie atenuowanych. W badaniach porównano 16 nowo otrzymanych sekwencji całego genomu terenu Polski do dotychczas posiadanych sekwencji polskich i sekwencji wirusa „macierzystego” z obszaru Gruzji z 2007r. Badania genetyczne ujawniły brak mutacji w genach strategicznych dla wirulencji ASF, wobec czego zaniechano prób klinicznych z użyciem szczepów terenowych do czasu uzyskania odpowiednio rokujących kandydatów szczepionkowych. Na uwagę zasługuje fakt, że analizy genetyczne ujawniły szereg pomniejszych różnic genetycznych w genach O174L, K145R, MGF 505-5R i regionie między- genowym IGR I73R/I329L pozwalających wykorzystać je jako markery przydatne w śledzeniu rozprzestrzeniania się ASF na terenie Polski.

W trakcie badań klinicznych, które zostały przeprowadzone w ramach projektu NCN: „Konstrukcja rekombinowanego szczepu wirusa afrykańskiego pomoru świń (ASFV) przy użyciu techniki CRISPR, 'Cas9'” uzyskano cenny materiał od świń-

ozdrowieńców. Który podlegał m. in. analizie pod kątem odpowiedzi immunologicznej zachodzącej w przebiegu choroby.

Na podstawie przeprowadzonych badań w zakresie odpowiedzi immunologicznej w wnioskuje się z dużym prawdopodobieństwem, że do efektywnego zwalczania choroby niezbędna jest odpowiedź z dwóch komponent układu immunologicznego tj. odpowiedzi immunologicznej humoralnej (wys. miana przeciwciał) i odpowiedzi immunologicznej komórkowej (wzrost odsetka limfocytów T).

W okresie od 2021 r. do chwili obecnej W ramach badania odpowiedzi immunologicznej przeciw ASFV, szczególną uwagę poświęcono na zbadanie interakcji przeciwciało-patogen w ASF. W ramach badań wyselekcjonowano surowice pochodzące od dobrze udokumentowanych przypadków ozdrowieńców. Wyselekcjonowane surowice (3 surowice pochodzące od dzików, 2 surowice pochodzące od świń) poddano badaniom in vitro w celu prześledzenia możliwości neutralizacji ASFV. Makrofagi płucne pobrane od świń zakażono terenowym szczepem ASF Pol\_18\_28298\_OI 11 w obecności wybranych surowic w dwóch stężeniach (10% i 20%). Wszystkie surowice poddano mianowaniu przeciwciał i wykazano ich wysokie miano.

Wyniki badań dowiodły, że pomimo zahamowania hemadsorpcji, replikacja wirusa zachodzi. Ma to prawdopodobnie związek z mechanizmem internalizacji wirusa (makropinocytoza konstytutowana), który w przeciwieństwie do innych znanych wirusów (np. Sars-COV-2) nie posiada strategicznych receptorów koniecznych do internalizacji, a tym samym nie istnieją przeciwciała zdolne do zablokowania tychże receptorów (stąd prawdopodobnie niepowodzenia szczepionek inaktywowanych i podjednostkowych). Wyniki te podkreśliły, że w organizmie gospodarza podczas efektywnego zwalczania choroby dochodzi do współgrania komponenty humoralnej i komórkowej. Wyniki przedstawiono w publikacji naukowej w 2022 roku

W latach 2021-2023 zaplanowano wspólny międzynarodowy projekt z ramienia programu ERA NET 1CRAD (IFNASF), wniosek został złożony w sierpniu 2020 przez konsorcjum:

- PIWet-PIB

- Centrum Biologii Molekularnej „Severo Ochoa” (Hiszpania),
- Uniwersytet Ludwiga Maksymiliana w Monachium (Niemcy)
- Szwedzki Narodowy Instytut Weterynaryjny (Szwecja).

Celem projektu jest zidentyfikowanie genów odpowiedzialnych za hamowanie wydzielania interferonu typu I, a następnie wprowadzenie mutacji nakierowanej na zidentyfikowane geny wirusa ASFV.

Przewagą projektu jest zastosowanie innowacyjnej techniki single-cell RNA-sequencing (scRNA-seq) umożliwiającej śledzenie mechanizmów regulacji wydzielania interferonu w pojedynczych komórkach, identyfikację subpopulacji komórek, w których w/w regulacja zachodzi oraz identyfikację genów ulegających ekspresji w procesie hamowania wydzielania interferonu.

W dalszym etapie projektu w wirulentnych szczepach ASFV zidentyfikowane geny zostaną poddane mutacji z użyciem techniki CRISPR/Cas9.

Równocześnie pragnę zapewnić, że działania związane ze zwalczaniem i zapobieganiem ASF w Polsce są prowadzone w sposób ciągły.

Realizowana jest redukcja populacji dzików w pierwszej kolejności w ramach planowej gospodarki łowieckiej (kompetencje Ministra Klimatu i Środowiska) oraz uzupełniająco w ramach odstrzału sanitarnego (nakazywanego przez powiatowych lekarzy weterynarii lub wojewodów – na wniosek wojewódzkich lekarzy weterynarii). Systematycznie prowadzone są akcje poszukiwania padłych dzików i ich szczątków na terenach występowania ASF oraz terenach zagrożonych występowaniem choroby – celem ich eliminacji ze środowiska. W akcjach poszukiwawczych wykorzystywane są dodatkowo odpowiednio przeszkolone psy, a skuteczność ich działania oceniana jest bardzo wysoko.

W przypadku pozyskiwania dzików duży nacisk kładziony jest również na kwestie przestrzegania przez myśliwych i osoby biorące udział w polowaniach zasad bioasekuracji. Inspekcja Weterynaryjna wykonuje w zakresie m.in. kontrole punktów przetrzymywania tusz odstrzelonych dzików w zakresie weryfikacji spełniania tych zasad.

Kolejnym elementem walki z ASF jest ograniczanie dalszego szerzenia się choroby po przez budowanie sztucznych barier mających na celu spowalnianie przemieszczania się dzików, w szczególności w okresie inkubacji choroby (ogrodzenia i zamykanie przejść dla zwierząt wzdłuż dróg ekspresowych i autostrad, bariery w postaci ogrodzeń siatkowych, bariery zapachowe, odłownie żywołowne).

Ponadto prowadzony jest w Polsce pasywny i aktywny monitoring u dzików i świń, w celu wczesnego wykrywania zakażenia i szybkiego wdrożenia działań zmierzających do przerwania łańcucha szerzenia się choroby i jej zwalczania. Likwidacja ognisk choroby jest realizowana sprawnie i zachowaniem odpowiednich procedur przez organy Inspekcji Weterynaryjnej.

Kolejnym istotnym elementem w zwalczaniu choroby jest także niezwłoczne reagowanie organów Inspekcji Weterynaryjnej na podejrzenia ASF w stadzie w tym w szczególności rzetelne prowadzenie dochodzenia epizootycznego, zabezpieczenie miejsca podejrzenia, pobranie próbek i ich wysyłka do laboratorium diagnostycznego oraz przekazanie informacji do władz zwierzchnich o podejrzeniu. Warto podkreślić, że istotną rolę w szybkim wykryciu i likwidacji choroby w stadzie odgrywają również hodowcy świń. Niezwłoczne zgłoszenie do lekarza weterynarii niepokojących objawów u świń, ogranicza ryzyko zawleczenia choroby do innych gospodarstw.

Mając jednak na względzie, że usuwanie skutków choroby pociąga za sobą dodatkowe koszty oraz prowadzi do dodatkowych obostrzeń i ograniczeń wynikających z obowiązujących w tym zakresie przepisów, w realizowanych działaniach duży nacisk jest położony na bioasekurację gospodarstw.

W tym zakresie Inspekcja Weterynaryjna planowo wykonuje kontrole gospodarstw utrzymujących świnie w zakresie spełniania wymagań bioasekuracji. Kontrolne bioasekuracji stanowią istotny element zapobiegający zawleczeniu choroby do gospodarstw utrzymujących świnie. Właściwa bioasekuracja gospodarstw i stosowanie się do wynikających z niej zasad, stanowią bowiem istotny element minimalizujący ryzyka przeniesienia wirusa na teren takich gospodarstw, zwłaszcza w sezonie intensyfikacji prac polowych.

Ważnym aspektem działań zaradczych są działania informacyjne oraz szkoleniowe. Dlatego też w szczególności do hodowców, lekarzy weterynarii, myśliwych, kierowane są różnego rodzaju akcje informacyjne, szkolenia, konferencje odnośnie zagrożenia chorobą i roli bioasekuracji w ochronie przed ASF. Na stronach internetowych Inspekcji, Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach, Ośrodków Doradztwa Rolniczego czy Generalnej Dyrekcji Lasów Państwowych prowadzone są stałe zakładki na temat ASF.

Z wyrazami szacunku

z up. Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi  
Krzysztof Cieciora  
podsekretarz stanu  
/podpisano elektronicznie/