



UNIVERSITÀ DI PARMA

Dipartimento di Scienze Medico-Veterinarie

Corso di laurea in Produzioni Animali Innovative e Sostenibili

**INQUADRAMENTO EPIDEMIOLOGICO DELLA PESTE SUINA
AFRICANA: NUOVO PERICOLO SANITARIO**

**EPIDEMIOLOGICAL FRAMEWORK OF AFRICAN SWINE FEVER: NEW
HEALTH HAZARD**

Relatore:

Chiar.mo Prof. Maria Cristina Ossiprandi

Correlatore:

Chiar.mo Dott. Andrea Luppi

Laureanda:

Irene Tedeschi

ANNO ACCADEMICO
2022/2023

Indice

<i>Abstract</i>	6
<i>Introduzione</i>	8
<i>CAPITOLO 1 – Background storico</i>	10
<i>Vettori del virus della peste suina africana</i>	12
<i>Africa orientale e australe</i>	15
<i>Africa occidentale</i>	15
<i>Correlazione stagionalità - incremento dei focolai in Sud-Africa</i>	16
<i>CAPITOLO 2- Inquadramento tassonomico e struttura</i>	17
<i>Proprietà fisico-chimiche</i>	18
<i>Struttura e composizione della particella del virus</i>	18
<i>Involucro esterno</i>	19
<i>Capside</i>	19
<i>Involucro interno</i>	20
<i>Guscio del nucleo</i>	20
<i>Nucleoide</i>	21
<i>Proteine</i>	21
<i>Meccanismo di invasione di ASFV</i>	22
<i>Assemblaggio dei virioni e trasporto di particelle virali mature</i>	24
<i>Fattori di virulenza</i>	24
<i>Diversità genetica e tipizzazione</i>	25
<i>Elusione dall'immunità innata</i>	26
<i>Inibizione della produzione o delle funzioni dell'interferone (IFN)</i>	26
<i>Infezione, mantenimento e trasmissione di ASFV</i>	27
<i>Ornithodoros Zecche morbide</i>	27
<i>Trasmissione di ASFV</i>	29
<i>Infezione da ASFV nei suini domestici</i>	32
<i>Trasmissione suino-cinghiale domestico</i>	32
<i>CAPITOLO 3- Presentazione clinica e valutazione anatomo-patologica macroscopica dell'infezione da ASFV (African swine fever) nei suini domestici</i>	34
<i>PSA iperacuta: segni clinici e lesioni</i>	35
<i>PSA acuta: segni clinici e lesioni</i>	35
<i>PSA subacuta: segni clinici e lesioni</i>	37
.....	38
<i>PSA cronica: segni clinici e lesioni</i>	39

<i>Patogenesi della deplezione linfoide</i>	40
<i>Patogenesi dei cambiamenti vascolari</i>	42
<i>Patogenesi nel cinghiale euroasiatico</i>	45
<i>ASFV in facoceri africani e maiali selvatici</i>	48
CAPITOLO 4- <i>Situazione epidemiologica mondiale</i>	49
<i>Distribuzione ASFV</i>	49
<i>Introduzione della PSA nella regione del Caucaso e nella Federazione russa</i>	52
<i>Epidemiologia della PSA in Europa</i>	54
<i>Penisola Iberica</i>	54
<i>Stati baltici, Polonia e Germania</i>	56
<i>Repubblica Ceca e Belgio</i>	58
<i>Asia orientale, sudorientale, Australia e Nuova Zelanda</i>	59
<i>Diffusione della PSA in America</i>	61
<i>Situazione epidemiologica in Italia</i>	62
<i>Nuova incursione di PSA nell'Italia continentale</i>	65
.....	66
<i>Diffusione della Peste Suina in Africana Repubblica Popolare Cinese e paesi limitrofi</i>	67
CAPITOLO 5- <i>Misure di controllo e prevenzione per la PSA: approccio One Health</i>	70
<i>La struttura dell'ASFV come spunto per la realizzazione di vaccini</i>	72
<i>Comprensione dei meccanismi immunitari indotti da ASFV e del loro possibile coinvolgimento nella realizzazione di un vaccino</i>	73
<i>Approcci vaccinali per la PSA</i>	75
<i>Vaccini inattivati</i>	75
<i>Vaccini a subunità, DNA e a virus vettore</i>	76
<i>Vaccini vivi attenuati (LAV)</i>	78
<i>Suini geneticamente modificati resistenti alle infezioni virali come alternativa alla terapia vaccinale</i> .	81
<i>Elevati livelli di biosicurezza come misura di prevenzione nell'introduzione di ASFV</i>	82
<i>Valutazione dell'efficacia di alcune categorie di disinfettanti nei confronti di ASFV</i>	83
<i>Farmaci anti-ASFV</i>	84
<i>Sopravvivenza del virus della peste suina africana in diversi salumi tradizionali italiani</i>	85
CAPITOLO 6- <i>Quadro normativo italiano per la gestione della PSA</i>	88
<i>Territorio continentale indenne</i>	89
<i>Prelievo di organi/carcassa da cinghiale rinvenuto morto o moribondo</i>	89
<i>Prelievo di organi/carcassa di cinghiale in caso di sospetto PSA</i>	90
<i>Prelievo di organi/carcassa per sorveglianza PSA in azienda suinicola</i>	91
<i>Prelievo di organi/carcassa in caso di sospetto PSA in azienda suinicola</i>	92
<i>Territorio continentale infetto- piano di eradicazione per PSA</i>	93

<i>Sorveglianza attiva nei cinghiali</i>	94
<i>Contaminazione ambientale da parte degli utilizzatori delle foreste nelle aree endemiche della peste suina africana</i>	94
<i>Conclusione</i>	98
<i>Bibliografia</i>	101

Abstract

Pig farming and the products derived represent a fundamental part, and for some countries the majority, of the world animal production market, as well as a deep link with the traditions and cultures of the various countries, which have always practiced this type of breeding. Italy, in Europe, is the country with the largest production of PDO (*Protected Designation of Origin*) cured meats and many fresh products that testify to its ancient link with this animal.

African Swine fever (ASF) is a viral disease, which is currently one of the main health problems affecting livestock and the pig industry worldwide. In Europe it is characterized by a domestic cycle, involving pigs and a sylvan cycle, involving wild boars, while on the African continent it affects several species of wild pigs.

Since its discovery in 1921, in Kenya, it has spread all over the world, over the years, also due to the high resistance of the virus in biological materials, in the soil, on the fomites and in the environment where it is further dispersed by various users of the forests. Finally, national and international trade in pig meat, or other swine products contributes greatly to its diffusion; for these reasons it represents a problem difficult to contain.

Due to its importance in the global economy, there have been a lot of studies conducted in recent decades aimed at finding a vaccine able to counter it, but this virus has numerous pitfalls and elements of particularity, due to its structure and its ability to evade the immune system, which make it unique in its kind, representing a new challenge for veterinarians and farmers.

It is therefore evident the need to adapt the current national surveillance plans to the new epidemiological situation, considering the correct procedures of biosecurity, cleaning and sanitization of farms and proper management of the wildlife concerned, wild boars, which represent the main viral reservoir.

This work intends to offer a complete overview of what is the world epidemiological situation, with some attention to the African continent, but above all concerning the Italian national situation, starting from the most recent introduction of ASF, as well as an accurate description of the pathology in its different clinical presentations.

It is evident the need to develop new approaches and measures to control the disease, thought the use of vaccine therapies and rigorous application of biosecurity in swine farms.

The prevention and management of AFV is a topic of Community interest (from the point of view of real and concrete Public Health), given its high diffusion, but above all its strong impact on the European pig sector, and consequently its influence on animal welfare, which is the fundamental aspect for a *One Health* approach.

This approach must clearly be supported and rigorously defined by appropriate Community regulations which must also provide for a "regionalisation" approach (due to the extreme intrinsic ductility of the virus) which must be applied in support of the disease control measures defined by the delegated regulation (EU) 2020/687.

Introduzione

L'allevamento suinicolo e i prodotti da esso derivati rappresentano una parte fondamentale, e per alcuni paesi maggioritaria, del mercato delle produzioni animali mondiale, oltre che un profondo legame con le tradizioni e le culture dei vari paesi, che da sempre praticano questo tipo di allevamento. L'Italia, in Europa, è il paese con la maggior produzione di salumi a marchio DOP (Denominazione di Origine Protetta) e molteplici prodotti freschi ne testimoniano il legame antico con questo animale.

La peste suina africana (PSA) è una malattia virale, che rappresenta attualmente uno dei principali problemi sanitari che affliggono l'allevamento e l'industria suinicola di tutto il mondo. In Europa è caratterizzata da un ciclo domestico, che coinvolge i suini e da un ciclo silvestre che interessa i cinghiali, mentre nel continente africano colpisce diverse specie di suidi selvatici.

Dalla sua scoperta, avvenuta nel 1921 in Kenya, si è poi diffusa in tutto il mondo nel corso degli anni, in ragione anche dell'elevata resistenza del virus nei materiali biologici, nel terreno, sui fomiti e nell'ambiente dove viene disperso ulteriormente dai vari utilizzatori delle aree boschive. Infine, il commercio nazionale ed internazionale di carni suine, o altri prodotti derivati, contribuisce notevolmente alla sua diffusione e, proprio per queste ragioni, rappresenta un problema difficile da contenere ed arginare.

Data la sua importanza per l'economia globale, sono stati numerosi gli studi condotti negli ultimi decenni finalizzati ad individuare un vaccino in grado di contrastarla; tuttavia, questo virus presenta numerose insidie ed elementi di estrema particolarità, dovuti alla sua struttura e alla sua capacità di evadere il sistema immunitario. Caratteristiche queste che lo rendono unico nel suo genere, rappresentando, di fatto, una nuova sfida per i medici veterinari e per gli allevatori.

Risulta evidente quindi, la necessità di adeguare gli attuali piani di sorveglianza nazionale alla nuova situazione epidemiologica, tenendo conto delle corrette procedure di biosicurezza, pulizia e sanificazione degli allevamenti associati ad una corretta gestione della fauna selvatica interessata (in particolare i cinghiali) che rappresenta il principale serbatoio virale.

Questo elaborato di tesi ha lo scopo di offrire una panoramica completa di quella che è la situazione epidemiologica mondiale, con una certa attenzione al continente Africano, ma soprattutto intende fare chiarezza sulla situazione nazionale, a partire dalla più recente introduzione di PSA, oltre che, fornire una descrizione accurata della patologia nelle sue differenti manifestazioni cliniche.

Risulta evidente la necessità di sviluppare nuovi approcci diagnostici, oltre a specifiche misure di controllo della malattia, mediante l'utilizzo di terapie vaccinali ed una rigorosa applicazione delle norme di biosicurezza all'interno degli allevamenti suini.

La prevenzione e la gestione della PSA risulta essere un argomento di interesse comunitario, data la sua elevata diffusione, ma soprattutto il suo forte impatto sul comparto suinicolo europeo, e di conseguenza la sua influenza sul benessere animale, che è l'aspetto fondamentale per un vero approccio *One Health*. Questo approccio, chiaramente, deve essere supportato e definito in maniera rigorosa da opportuni regolamenti comunitari che debbono inoltre prevedere un approccio di "regionalizzazione" (vista l'estrema duttilità intrinseca del virus) che deve applicarsi a supporto delle misure di controllo delle malattie definite dal regolamento delegato (UE) 2020/687 (Regolamento 17 dicembre 2019, 2020).

CAPITOLO 1 – Background storico

In Africa, il bestiame contribuisce considerevolmente all'economia agricola nazionale. Sulla base del rapporto proposto dal Dipartimento dell'Agricoltura, delle Foreste e della Pesca (DAFF: Department of Agriculture, Forestry and Fisheries) in Sud-Africa gli animali d'allevamento contribuiscono circa alla metà della produzione agricola e rappresentano la stragrande maggioranza del fabbisogno di carne, 85%, con l'industria suina che rappresenta specificatamente il 21,5% del settore agricolo primario (Ciza A., et al., 2021).

Nei primi anni del 1900, la peste suina africana emerse dall'antico serbatoio della fauna selvatica in Africa orientale. È stata descritta per la prima volta in Kenya come febbre emorragica acuta nei suini domestici con una mortalità che si avvicinava al 100% (Montgomery, 1921). Al contrario, nei suoi ospiti selvatici suidi africani, provoca lievi segni clinici e può causare infezioni persistenti a lungo termine (Jori, et al., 2013).

Il ciclo del facocero e delle zecche è stato descritto in sette paesi dell'Africa meridionale e orientale. L'ASF (*African Swine Fever*) successivamente si diffuse attraverso le popolazioni di suini domestici nella maggior parte dei paesi sub-sahariani, raggiungendo l'Africa occidentale, all'incirca, nel 1950. La malattia è rimasta endemica generando focolai sporadici nella maggior parte dei paesi dell'Africa sub-sahariana, causando un elevato impatto socioeconomico sia tra la popolazione rurale più povera come pure tra gli imprenditori agricoli impegnati nel commercio (Penrith, 2013),

La peste suina africana è una malattia emorragica virale con letalità eccezionalmente elevata nei suini domestici e nei cinghiali euroasiatici. Nell'ultimo decennio, la ASF è emersa in diversi paesi europei e asiatici e ora mostra una distribuzione senza precedenti (Blome, et al., 2020). Considerata una minaccia significativa non solo, per la produzione di carne suina in Europa, ma anche per quella mondiale. Nel 2018 il virus è emerso inaspettatamente negli allevamenti di suini in diversi paesi, quali ad esempio la Federazione Russa (Kolbasov, et al., 2018), la Cina, la Mongolia, il Vietnam e la Corea del Sud (Kim, et al., 2020).

Nonostante la sua gamma limitata di ospiti e l'assenza di potenziale zoonotico, il suo impatto socioeconomico è molto elevato. Per questo motivo, la malattia è soggetta a denuncia all'Organizzazione mondiale per la salute animale (OIE: *Office International des Epizooties*) (Blome, et al., 2020).

Nel 2007, l'ASFV (*African Swine Fever Virus*), che affonda le sue radici in un ciclo selvatico nell'Africa sub-sahariana, è stata introdotta in Georgia. Successivamente, il virus si è diffuso nella regione transcaucasica e ha raggiunto la Federazione Russa. Dalla Russia, il virus si è spostato ulteriormente e ha invaso l'Unione Europea nel 2014. Nell'agosto 2018, la malattia ha raggiunto anche il più grande produttore di suini del mondo, la Cina, e ora si sta diffondendo in diversi paesi asiatici.

Gli ultimi paesi colpiti sono stati la Papua Nuova Guinea alle porte dell'Australia e l'India nel 2020. Pertanto, negli ultimi anni la peste suina ha acquisito una diffusione e un'importanza senza precedenti. Soprattutto la situazione epidemica in Asia ha rivelato debolezze nei settori veterinario e agricolo, ma anche vari legami diretti e indiretti tra l'industria suina e il riciclaggio e l'uso dei sottoprodotti.

Ad esempio, è interessata la fornitura di eparina e la disponibilità di gelatina per alimenti e dolci, ma anche l'utilizzo di grassi animali oltre a pelli e setole. Inoltre, l'uso poco oculato di materiali suini come fonte proteica nei mangimi accelera la diffusione dell'epidemia (Blome, et al., 2020).

La via di trasmissione naturale da facoceri a suini domestici è stata chiarita solo molto più tardi, dopo aver trovato le prove del coinvolgimento di una zecca della Famiglia delle *Argasidae* responsabile del mantenimento e della trasmissione del virus (Botija, 1963).

Vettori del virus della peste suina africana

La competenza vettoriale è definita come la capacità fisiologica di un organismo vettore di acquisire, mantenere e trasmettere un agente infettivo. Le zecche molli del complesso *Ornithodoros* sono le uniche specie che fungono da vettori competenti per il virus della peste suina africana. L'ASFV si replica nella specie *Ornithodoros moubata* e può essere trasmessa tra maschi e femmine di questa specie per via transtadiale, transovarica. Le zecche possono essere infettate nutrendosi di suidi infetti e possono, a loro volta trasmettere il determinante di malattia ad altri ospiti tramite l'alimentazione. Le specie di zecche molli prendono contatto con l'ospite per nutrirsi per un periodo limitato (Dixon, et al., 2019).

La malattia in Africa sub-sahariana viene trasmessa quindi, in un antico ciclo selvatico tra facoceri e zecche molli appartenenti al genere *Ornithodoros* che fungono da vettore artropode competente. Questo ciclo non è accompagnato da malattie evidenti o mortalità nei facoceri e probabilmente passerebbe inosservato (Jori, et al., 2013). Il virus è estremamente contagioso e la mancanza di un vaccino efficiente, insieme al coinvolgimento di ospiti selvatici in grado di mantenere il virus e l'esistenza di grandi popolazioni libere di suini domestici sono considerati i maggiori ostacoli per il controllo e l'eventuale eradicazione della malattia.

La peste suina africana rimane un problema endemico in Madagascar e in molti paesi dell'Africa e ci sono prove che ciò rappresenta una minaccia per la popolazione suina e l'economia rurale di altri continenti e regioni. È ad esempio il caso dell'introduzione e della diffusione dell'ASFV dall'Africa meridionale al Madagascar nel 1998 (Bastos, et al., 2003), a Mauritius nel 2007 (Lubisi, et al., 2009) e più recentemente nel Caucaso e in Russia (Rowlands, et al., 2008).

In assenza di un vaccino efficace, l'unica possibilità per mitigare la trasmissione e la diffusione della malattia è quella di attuare misure di controllo sanitario basate su una solida conoscenza della sua epidemiologia e del suo ciclo eziopatogenetico.

Tuttavia, questo è complicato dal fatto che molti aspetti riguardanti il ruolo degli ospiti selvatici e dei vettori coinvolti nel ciclo silvestre dell'infezione rimangono sconosciuti. Inoltre, il loro contributo

come serbatoi e vettori della malattia può variare nei diversi continenti e regioni. I suidi selvatici, come facoceri (*Phacochoerus spp.*) e potamoceri (*Potamochoerus spp.*), da un lato, e zecche molli dall'altro, sono considerati gli ospiti naturali nel ciclo silvestre in Africa e potenzialmente nell'Oceano Indiano (Plowright, 1981).

Il fatto che i facoceri fossero presenti in tutti i paesi dell'Africa in cui la peste suina africana veniva diagnosticata nei suini domestici venne notato per la prima volta dal ricercatore Thomson (Thomson, 1985). Tuttavia, l'infezione dei facoceri con ASFV e associazione tra zecche complesse *Ornithodoros moubata* e facoceri è stata stabilita solo nei paesi dell'Africa orientale e meridionale (Penrith, et al., 2004). I risultati in altri paesi non sono riusciti a fornire prove convincenti del ciclo silvestre facocero/zecca e hanno dimostrato il mantenimento della ASFV nei suini domestici (Penrith, et al., 2004).

Il potamocero è stato considerato di minore importanza nell'epidemiologia della ASFV rispetto al facocero, ma poiché è notturno e sfuggente, le informazioni su questa specie sono estremamente scarse. Quest'ultima specie è stata sospettata di essere un serbatoio di ASFV in aree dove non vi sono facoceri, ma il virus è assolutamente endemico (Haresnape, et al., 1985).

I livelli di virus del sangue in un potamocero infetto sono sufficientemente elevati da infettare sia le zecche molli che i maiali domestici (Anderson, et al., 1998). Tuttavia, i potamoceri non vivono nelle tane e quindi non entrano in contatto con le zecche molli sopraccitate (Costard, et al., 2009).

È stato riferito dagli abitanti locali che l'incrocio tra potamocero e maiale domestico allo stato brado può verificarsi, ed è stato ipotizzato che gli ibridi, se esistono, potrebbero diventare portatori asintomatici tra i maiali domestici e quindi potrebbero mantenere la diffusione del virus in popolazione, perché i potamoceri di razza pura non presentano alcun segno clinico (Jori, et al., 2009). Questi ultimi sono cacciati per la loro deliziosa carne in molti paesi africani e in Madagascar, gli avanzi somministrati ai maiali domestici potrebbero portare all'infezione se la quantità di virus nei tessuti è abbastanza elevata (Jori, et al., 2009).

Sulla base di indagini in Africa orientale e meridionale, è stato stabilito che le zecche molli *Ornithodoros* vivono in tane di facocero e trasmettono ASFV a facoceri giovani. Inoltre, sviluppano

livelli sufficientemente elevati di viremia tali da infettare altre zecche che compiono su di loro il pasto di sangue. Le zecche infette sarebbero occasionalmente trasportate da facoceri adulti in aree dove vi è la presenza di allevamenti infettando così suini domestici, costituendo e realizzando in questo modo il passaggio tra ciclo silvestre e domestico (Plowright, et al., 1994). Allo stesso modo, alla luce delle indagini comparative eseguite sul virus, sembra che il ciclo silvestre abbia permesso la selezione di nuovi isolati virali con maggior virulenza per il ciclo domestico poiché la maggior variazione genetica, con un maggior numero di genotipi, si verifica nell’Africa orientale e meridionale (Lubisi, et al., 2005).

Mancano le prove di un ciclo silvestre che coinvolge suidi selvatici e zecche molli nell’Africa Occidentale e centrale per diverse ragioni ecologiche. Ad esempio, le zecche molli endofile di *Ornithodoros* non possono sopravvivere negli habitat umidi delle foreste tropicali ed equatoriali. In queste foreste, i suidi selvatici diversi dai facoceri sono predominanti, ma non utilizzano habitat sotterranei adatti a queste zecche molli endofile. Anche nelle zone più aride dell’Africa occidentale e centrale, le tane del facocero non hanno la stessa struttura profonda dell’Africa orientale, e questo potrebbe aver impedito l’insediamento delle zecche molli (Gray, et al., 2014).

Caratteristiche epidemiologiche	Cinghiale (<i>Sus scrofa</i>)	Bushpig (<i>Potamochoerus larvatus</i>)	Maiale rosso di fiume (<i>Potamochoerus porcus</i>)	Warthog (<i>Phacochoerus africanus</i>)	Maiale gigante della foresta (<i>Hylochoerus meinertzhageni</i>)
Distribuzione geografica	Europa e Asia	Africa orientale e meridionale, Madagascar	Africa centrale	Savane africane	Africa orientale e centrale
Rilevato in popolazioni naturali	Si	Si	No	Si	Si
Resistenza naturale	No	Si	Sospettato	Si	Si
Mortalità naturale in caso di infezione	Si	No	Non segnalato	No	No
Mantenimento del virus nelle popolazioni naturali	Si	Sconosciuto	Sconosciuto	Solo in presenza di zecche argasidi	Sconosciuto
Trasmissione orizzontale	Si	Sconosciuto	Sconosciuto	No	Sconosciuto

Tabella 1- Caratteristiche epidemiologiche delle diverse specie di suidi selvatici per quanto riguarda la trasmissione della peste suina africana (Dixon, et al., 2019).

Africa orientale e australe

L'Africa orientale e meridionale sono senza dubbio le aree dell'Africa sub-sahariana nelle quali il ciclo silvestre della peste suina africana è stato studiato più ampiamente. Un'associazione tra maiali africani selvatici e focolai di peste suina africana in Kenya è stata sospettata precocemente ed è stato confermato sperimentalmente come sia i facoceri, che i potamoceri siano suscettibili alle infezioni ma non sviluppino segni clinici; inoltre, la trasmissione dai maiali selvatici ai suini domestici poteva verificarsi esclusivamente mediante inoculazione di sangue infetto (Montgomery, 1921).

Per comprendere l'andamento epidemiologico di questa malattia infettiva, occorre ricordare come i facoceri risultino ampiamente distribuiti in Africa meridionale nella savana tropicale e subtropicale (Jori, et al., 2009).

Le indagini sierologiche hanno rivelato che un'alta percentuale di facoceri in Kenya e Tanzania, dove sono estremamente diffusi, e circa il 50% dei facoceri in Uganda possedevano anticorpi nei confronti di ASFV (Plowright, et al., 1994). In Sudafrica facoceri infetti sono stati rilevati nella parte nord-orientale del paese in un'area che comprende la provincia del Limpopo e il Kruger National Park; proprio per ragioni sanitarie, questa zona è stata dichiarata area di controllo della peste suina africana nel 1935 (Kock, et al., 1940)

Africa occidentale

Le informazioni sul ciclo silvestre in Africa occidentale sono molto esigue malgrado si sia presentata da molti anni. In Nigeria, dove la malattia è endemica, un'indagine sierologica condotta più di 30 anni fa in facoceri e potamoceri non è riuscita a rilevare gli anticorpi in queste specie di suini selvatici. Più recentemente, un potamocero è stato trovato infetto sulla base del rilevamento molecolare del DNA genomico virale (Luther, et al., 2007) e recentemente caratterizzato come genotipo 1, confermando la suscettibilità di *Potamocheorus porcus* all'ASFV (Owolodun, et al., 2010).

Si tratta, tuttavia, di casi isolati e fino ad oggi non si registrano studi su larga scala focalizzati sugli ospiti selvatici in Africa occidentali, ad eccezione del Senegal. In questo paese costiero dell'Africa occidentale, il settore suinicolo svolge un importante ruolo economico nelle regioni che ospitano la maggior parte delle popolazioni non musulmane e consiste principalmente in sistemi di allevamento

tradizionali all'aperto su piccola scala in cui i maiali non sono confinati per la maggior parte dell'anno (Etter, et al., 2011).

Dalla prima descrizione della malattia nel 1959, il Senegal ha sperimentato il riemergere regolare di focolai di peste compatibili con una fonte permanente di virus proveniente da suini domestici, ma anche con la possibile esistenza di un ciclo silvestre, sebbene per ora non sia ancora stato definitivamente confermato. Inoltre, la presenza di facoceri in molte aree protette del paese è comune, anche se la caccia eccessiva ha seriamente impoverito le loro popolazioni in alcune regioni. Allo stesso tempo i potamoceri un tempo comuni nel sud del paese, sono ora quasi del tutto estinti. La zecca molle presente in Senegal è *Ornithodoros sonrai* che è strettamente correlata a *O. moubata*, ed è stata ritrovata in tane di roditori all'interno o vicino a insediamenti umani e porcili, con tasso di infezione che va dall'8 al 36% nel Senegal centrale.

Correlazione stagionalità - incremento dei focolai in Sud-Africa

Alcune ricerche evidenziano come la stagione abbia un effetto significativo sul numero di focolai, nonostante il fatto che siano segnalati, con una certa prevalenza, in tutte le stagioni. L'estate è la stagione con il maggior numero di focolai, sembra logico, in quanto un maggior numero di maiali si muovono e vengono macellati intorno al periodo natalizio, e questo effetto stagionale è più probabile che sia legato al movimento dei maiali piuttosto che alle condizioni climatiche e ambientali. Inoltre, il periodo riconducibile alla tarda primavera e all'inizio dell'estate è riconosciuto come il periodo del parto per i facoceri e corrisponde, chiaramente, ad un aumento della viremia nei facoceri neonati (MushagalusaI, et al., 2021).

CAPITOLO 2- Inquadramento tassonomico e struttura

L'agente eziologico della PSA è il virus della peste suina africana (ASFV: *African swine fever virus*), un grande virus a DNA, a doppio filamento del genere *Asfivirus* all'interno della famiglia *Asfarviridae* (Alonso, et al., 2018).

Secondo quanto pubblicato, sotto il profilo tassonomico, nel 2019 dall'International Committee on *Taxonomy of Viruses* (EC 51, Berlino, Germania, luglio 2019), la famiglia *Asfarvirida* è stata inclusa nell'ordine degli *Asfuvirale* e nella classe dei *Pokkesviricetes*.

Oltre a questa nomenclatura ufficiale, è stato ampiamente discusso e in modo controverso per includere ASFV nell'ordine provvisorio dei *Megavirales* contenenti il gruppo monofiletico ma eterogeneo dei virus nucleocitoplasmatici a DNA grande (NCLDV: *nucleocytoplasmic large DNA viruses*) (Andres, et al., 2020).

La famiglia *Asfarviridae* comprende la singola specie del virus della peste suina africana, i cui isolati presentano genomi lineari dsDNA di 170-194 kbp (Tabella 2. *Asfarviridae*). Non ci sono virus strettamente correlati (Alonso, et al., 2018).

Si tratta dell'unico virus a DNA, che si replica nel citoplasma cellulare, trasmesso da insetti appartenente alla famiglia dei virus nucleoplasmatici a DNA grande (NCLDV) con struttura icosaedrica e un involucro (Wang, et al., 2021).

Caratteristico	Descrizione
Membro tipico	Virus della peste suina africana BA71V (U18466), specie <i>Virus della peste suina africana</i> , genere <i>Asfivirus</i>
Virion	Strati multipli di nucleo, involucro interno, capsidi e involucro esterno. L'elaborazione delle poliproteine da parte di una proteasi virale produce più proteine strutturali a subunità
Genoma	DsDNA lineare, 170-194 kbp con loop terminali complementari
Replicazione	Citoplasmatico con una fase nucleare precoce non completamente caratterizzata. Intermedi replicativi concatenatori testa a testa simili ai poxvirus. La trascrizione e l'elaborazione dell'RNA utilizzano enzimi codificati da virus
Traduzione	Da mRNA con 5'-caps e 3'-poliadenilazione
Intervallo host	Maiale domestico, cinghiale, facocero e maiale selvatico; trasmesso per contatto, ingestione o zecche <i>Ornithodoros</i>

Tabella 2- Caratteristiche dei membri della famiglia *Asfarviridae* (Covadonga, et al., 2018).

Proprietà fisico-chimiche

Il virus della PSA è estremamente stabile, resiste ad un ampio range di pH e di temperatura. Il virus viene inattivato dalla luce diretta, da specifici disinfettanti e dalla temperatura di cottura (es. 70°C per 30 minuti). Il virus sopravvive nella carne e nei visceri per 105 giorni, nella carne salata per 182 giorni, in carne/grasso e pelle essiccata per 300 giorni e nella carne congelata per diversi anni. Essendo resistente all'autolisi il virus rimane infettante anche nelle carcasse per diverse settimane a seconda delle temperature ambientali.

I virioni sono sensibili all'etere, al cloroformio e al desossicolato e vengono inattivati a 60°C entro 30 minuti, pur sopravvivendo per anni a valori di temperatura pari a 20°C o a 4°C. L'infettività è stabile su un ampio intervallo di pH. Alcuni ceppi particolarmente virulenti possono sopravvivere al trattamento a pH 3 o pH 13.

I disinfettanti efficaci sono formaldeide 1% per 6 giorni, e NaOH 2% per un giorno, inoltre; i disinfettanti parafenilfenolici sono molto efficaci. In diversi studi è stata evidenziata la sensibilità del virus all'irradiazione (Blome, et al., 2020).

Struttura e composizione della particella del virus

La particella di ASFV ha una morfologia icosaedrica con diametro medio di 200 nm ed è composta da diversi domini concentrici: un nucleo interno formato dal nucleotide centrale contenente il genoma rivestito da uno spesso strato proteico designato come guscio del nucleo, un involucro lipidico interno che circonda il nucleo e il capsido, che è lo strato più esterno dei virioni intracellulari. I virioni extracellulari possiedono un involucro esterno acquisito per gemmazione dalla membrana plasmatica (Carrascosa, et al., 1984), Figura 1

L'analisi bidimensionale di virus extracellulari purificati ha identificato 54 proteine strutturali con pesi molecolari compresi tra 10.000 e 150.000 (Esteves, et al., 1986).

I virioni contengono anche il corredo necessario al meccanismo trascrizionale finalizzato alla sintesi, al *capping* (una delle tappe di maturazione del pre-mRNA a mRNA che consiste nell'aggiunta di un "cappuccio" di 7-metil guanosina al residuo 5-terminale della catena con un insolito legame 5,5' trifosfato) e alla poliadenilazione dell'RNA precoce. Attualmente sono noti 19 geni che codificano per proteine strutturali ed è stata identificata la localizzazione di alcune di queste proteine nei diversi domini della particella virale (Dixon, et al., 2012).

Involucro esterno

L'involucro esterno è lo strato più esterno di ASFV, la sua morfologia è simile alla "membrana unitaria" caratteristica della membrana plasmatica, in accordo con il processo di gemmazione per la fuoriuscita del virus dalla cellula (Breese, et al., 1966).

È stato riportato come la proteina p12 di adesione del virus si localizzi nell'involucro esterno in diversi studi di microscopia immunoelettronica (Carrascosa, et al., 1993).

Alcune frazioni della proteina pEP402R (CD2v) sono state rilevate sullo strato esterno dei giovani virioni. L'omologo virale pE402R è l'unica molecola marcatrice della struttura del virus esterno (Revilla, et al., 2018).

Capside

Il diametro del capsido di ASFV è di circa 250 nm. Il capsido mostra simmetria icosaedrica (T= 189-217) corrispondente ai capsomeri del 1892-2172. I componenti del capsido corrispondono a 2.760 capsomeri pseudo-esamerici e a 12 capsomeri pentamerici. La proteina pB438L è necessaria affinché il capsido formi i suoi vertici (Wang, et al., 2019).

Ogni capsomero ha un diametro di 13 nm e larghezza di 5-6 nm, appare come un prisma esagonale o pentagonale con un foro centrale. La distanza intercapsomerica è pari a 7,4-8,1 nm. La proteina p72, codificata dal gene B646L costituisce il componente principale dei capsomeri e rappresenta circa un terzo della massa proteica della particella virale (Garcia-Escudero, et al., 1998).

Una membrana interna circonda il guscio del nucleo che riveste il nucleotide contenente acido nucleico. I virioni con involucro extracellulare hanno un diametro di 175-215 nm (Salas, et al., 2013).

Un altro componente del capsid è la proteina pE120R coinvolta nel trasporto delle particelle mature di ASFV alla membrana plasmatica per l'uscita dalla cellula (Andres, et al., 2001).

Involucro interno

Il terzo strato, l'involucro interno, è una membrana lipidica a doppio strato spessa 70 Å divisa dal reticolo endoplasmatico (Revilla, et al., 2018). Diversi studi recenti hanno evidenziato come pE183R rappresenti una proteina chiave coinvolta nella formazione dell'involucro interno (Alejo, et al., 2018).

Evidenze morfologiche e immunocitochimiche mostrano che l'involucro interno è derivato dal reticolo endoplasmatico, attraverso un meccanismo attualmente ancora poco conosciuto (Rouiller, et al., 1998).

È interessante notare che la proteina p12 di adesione del virus, che inizialmente è stata localizzata nell'involucro esterno del virus, è anche un componente dell'involucro interno, e diversi studi indicherebbero che la proteina trans-membranaria p12 potrebbe svolgere un ruolo morfogenetico (Salas, et al., 2013).

Guscio del nucleo

Il quarto strato ha un diametro di 180 nm, chiamato guscio centrale, e ha uno spessore di circa 30 nm.

Questo dominio è costituito principalmente da due tipi di precursori poliproteici virali, pp220 e pp62, sono suddivisi in molti prodotti maturi attraverso la proteasi virale codificata dal gene pS273R, per formare il guscio centrale, che appartiene alla famiglia delle proteasi SUMO-1 specifiche e correlate, incluse le proteasi 17 dell'adenovirus e del virus vaccinia (Alejo, et al., 2018).

Nucleoide

La parte più interna della particella virale è il nucleoide. Il genoma di ASFV è di circa 170-194 kbp di DNA lineare a doppio filamento e codifica per 150-170 ORF (*open reading frames*). Le estremità del genoma mostrano ripetizioni terminali invertite e sono chiuse da anelli a forcina.

Il genoma di ASFV codifica per molte proteine non strutturali correlate alla replicazione, alla trascrizione e all'immunosoppressione del virus (Alejo, et al., 2018). Sono state determinate le sequenze nucleotidiche complete di 18 isolati. Questi includono l'isolato Ba71V adattato alla coltura tissutale (ASFV-BA71V) e 17 isolati di campo provenienti da Europa e Africa (Chapman, et al., 2008).

Codifica per 150-200 proteine virali, tra cui 68 proteine strutturali e più di 100 proteine non strutturali. La ripetizione e la perdita di alcune sequenze del genoma ASFV è uno dei fattori usati per differenziare ceppi provenienti da fonti diverse o da generazioni dello stesso ceppo (Dixon, et al., 2013).

Il genoma codifica per molte proteine che sono coinvolte nell'assemblaggio del virus, nella replicazione e nella riparazione del DNA. Inoltre, le proteine coinvolte nella modulazione immunitaria, ad esempio interferendo con l'interferone di tipo I e le vie di morte cellulare, sono codificate. Circa la metà dei geni ASFV manca ancora di qualsiasi funzione nota o prevedibile (Alejo, et al., 2018).

Proteine

I virioni contengono più di 50 proteine, tra cui un certo numero di enzimi e fattori necessari per la trascrizione e l'elaborazione precoce dell'mRNA. Gli enzimi impacchettati nei virioni includono la multi-subunità RNA polimerasi, poliA poliasi, guanilil transferasi e proteina chinasi (Cristina, et al., 2010).

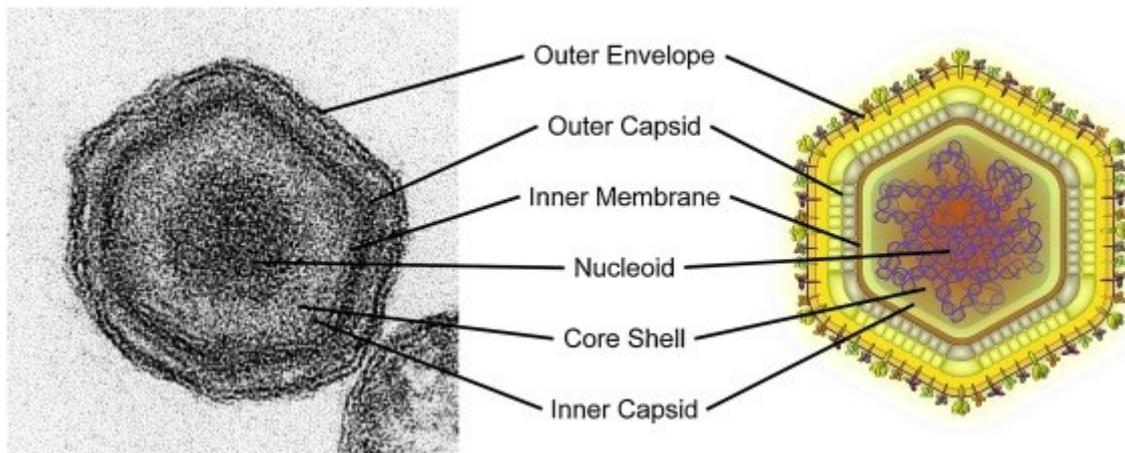


Figura 1-Struttura del virus della peste suina africana. Lato sinistro, Micrografia elettronica di una particella ASFV fissata chimicamente incorporata nella resina. Lato destro, panoramica schematica della struttura della particella. La particella mostra la tipica simmetria icosaedrica con nucleotide contenente il genoma del DNA a doppio filamento (Blome, et al., 2020).

Meccanismo di invasione di ASFV

Il virus della peste suina africana si replica principalmente nelle cellule del sistema mononucleare-fagocitico e l'ingresso avviene attraverso endocitosi e macropinocitosi mediata da clatrina e dinamina-dipendente (Galindo, et al., 2015).

Attualmente, sono state dimostrate diverse modalità di ingresso cellulare per ASFV (Galindo I, 2017).

I primi studi sull'ingresso di ASFV indicano meccanismi dipendenti da un recettore, con il coinvolgimento del pH ed eventi dipendenti dalla temperatura.

Dato il tropismo cellulare di ASFV diversi recettori macrofagici sembrano essere implicati tra cui CD163 (CD, *Cluster of Differentiation* ovvero cluster di differenziazione), CD45, MHC II (MHC, *Major Histocompatibility Complex*), sebbene non sia stato ancora identificato con precisione alcun recettore specifico per ASFV (Lithgow, et al., 2014).

Precedenti studi in vitro avevano evidenziato CD163 come recettore significativo per l'ASFV, dimostrando che gli anticorpi monoclonali potevano bloccare l'infezione.

Tuttavia, l'infezione di suini geneticamente modificati privi di CD163 non ha mostrato alcuna differenza nel corso dell'infezione o nella sopravvivenza rispetto a suini selvatici che esprimevano

CD163, indicando così che sono coinvolti altri recettori o meccanismi di ingresso (Popescu, et al., 2017).

Sono stati studiati altri meccanismi, tra cui la fagocitosi e l'ingresso non recettoriale mediato dalla macropinocitosi, che è l'assorbimento non selettivo e actina dipendente delle molecole, ed è utilizzata da diversi virus grandi a DNA. L'attuale modello per l'ingresso di ASFV include sia l'endocitosi mediata da clatrina che la macropinocitosi (Simoes, et al., 2019).

È stato dimostrato che anche l'endocitosi actina-dipendente e il flusso endocitico che coinvolgono l'attività dei microtubuli sono implicati, indicando la dinamica propria della fagocitosi classica (Basta, et al., 2010). L'identità del recettore cellulare e il suo ligando virale sono ancora sconosciuti.

Il recettore CD163, come già citato in precedenza, è stato discusso in modo controverso perché in diverse prove sperimentali si è riscontrato come suini con inattivazione del CD163 fossero ancora pienamente suscettibili ad ASFV (Popescu, et al., 2017).

All'ingresso, l'intera via endosomiale è necessaria per il rivestimento e il capsidone viene smantellato a pH acido del lume endosomiale (Cuesta-Geijo, et al., 2012)

Dopo la degradazione del capsidone e la fusione della membrana, mediata da pE248R, i nuclei virali vengono rilasciati nel citoplasma. Per il rilascio del DNA virale, è necessario il sistema ubiquitina-proteasoma. La replicazione e l'assemblaggio avvengono in speciali "fabbriche" di virus vicino al nucleo e i virioni di nuova costruzione vengono rilasciati dalle cellule infette per gemmazione.

Per la trascrizione fortemente regolata e l'elaborazione dell'RNA, sono necessari enzimi codificanti del virus (Almazan, et al., 1992).

La maggior parte della replicazione virale avviene nel citoplasma, viene descritto uno stadio nucleare precoce che comporta lo "smontaggio" localizzato della lamina e la redistribuzione delle proteine nucleari. In diversi studi si riporta l'ipotesi che l'infezione da ASFV potrebbe attivare percorsi di risposta al danno del DNA (DDR, *DNA Damage Response*) che alterano il passaggio nucleare e le firme epigenetiche cellulari e facilitano l'infezione efficace e la formazione della progenie (Simões, et al., 2013).

Ad esempio, un'efficiente replicazione dell'ASFV dipende dall'interazione con i corpi nucleari della leucemia promielocitica associati al controllo del ciclo cellulare, all'apoptosi e alle risposte

immunitarie. Inoltre, la formazione di eterocromatina è indotta, probabilmente per silenziare i geni ospiti che codificano proteine che potrebbero essere dannose per la replicazione del virus.

Questi riarrangiamenti indotti dal virus potrebbero probabilmente spiegare la rottura della lamina sopra menzionata (Simões, et al., 2019).

Nel loro insieme, l'ASFV interrompe i domini subnucleari e la struttura della cromatina e induce cambiamenti nell'architettura nucleare per migliorare un ambiente nucleare repressivo che consente un'efficiente replicazione del virus nella cellula ospite. Tuttavia, il ruolo completo del nucleo non è ancora chiaro e necessita di ulteriori indagini (Blome, et al., 2020).

Assemblaggio dei virioni e trasporto di particelle virali mature

I microtubuli svolgono un ruolo essenziale nel trasporto cellulare dell'ASFV e nella formazione di “fabbriche” virali anche definite fabbriche replicative (Matos, et al., 1993).

Microtubuli e chinesina lavorano insieme per sostenere lo sviluppo dei virioni di PSA dalla cellula infetta (Jouvenet, et al., 2004). ASFV p54 interagisce con i microtubuli ed è necessario per la formazione di “fabbriche” virali e il reclutamento di precursori dell'involucro nei siti di assemblaggio dei virioni (Rodriguez, et al., 2004).

La proteina del capsido virale pE120R facilita il trasporto di particelle virali mature dai siti di assemblaggio alla membrana plasmatica, dove il virus acquisisce il suo involucro esterno derivato dall'ospite (Andres, et al., 2001). Complessivamente, un intero ciclo di infezione da ASFV, dall'adesione, ingresso e sviluppo di particelle virali mature, è completo entro 24 hpi (*hours post-infection*) (Munoz-Moreno, et al., 2015).

Fattori di virulenza

ASFV codifica per almeno 150 proteine, finora 38 proteine di queste sono state associate a funzioni note o previste nel metabolismo dei nucleotidi, nella trascrizione, nella replicazione e nella riparazione; più di 24 proteine ASFV risultano coinvolte nella struttura e nella morfogenesi del virione e almeno 8 di esse sono probabilmente coinvolte nelle interazioni delle cellule ospiti (Dixon, et al., 2013).

Tutte le funzioni di un gran numero di proteine codificate da ASFV rimangono ancora sconosciute o ancora definite nel loro ruolo biologico. Questo virus codifica per diversi prodotti genici coinvolti nella virulenza e nel contrasto delle risposte antivirali dell'ospite, come già citato in precedenza (Wang, et al., 2018).

I geni MGF360 hanno il maggior numero di copie e sono i più variabili tra i ceppi di ASFV (Dixon, et al., 2013). I ceppi di ASFV naturalmente attenuati mancano tipicamente di copie multiple dei geni *MGF360* e *MGF505/530* e del gene *CD2v* (Dixon, et al., 2013).

Inoltre, è stato dimostrato che la delezione mirata di alcuni geni all'interno di MGF360 e MGF505, o di *CD2v*, è in grado di attenuare alcuni ceppi di ASFV *wild-type*, ma non tutti, indicando come altri geni/fattori si dimostrino rilevanti per la virulenza dell'ASFV (Borca, et al., 1998).

Diversità genetica e tipizzazione

Negli ultimi decenni, diverse regioni genetiche sono state utilizzate per tipizzare i ceppi di ASFV mediante sequenziamento parziale di piccoli frammenti di DNA e la regione utilizzata per la denominazione del genotipo è spesso la regione codificante *p72*. Una maggiore discriminazione si ottiene attraverso il sequenziamento dei geni *p54*, *p72* e *pB602L* (Gallardo, et al., 2009).

Ad esempio, sulla base di questo sistema, 24 genotipi di ASFV sono stati identificati in Africa (Wade, et al., 2019).

La diversità genetica è promossa attraverso il ciclo silvestre e non esiste al di fuori di queste regioni. Inoltre, i genotipi non sono correlati alla virulenza o alla patogenicità. I genotipi "internazionali" sono I e II.

In generale, l'ASFV è estremamente stabile e mostra un tasso di mutazione molto basso (Dixon, et al., 2020). Ciò porta ad una bassa variabilità genetica nelle regioni colpite e anche l'utilizzo di tecniche di sequenziamento di nuova generazione, di solito, non consente il tracciamento molecolare dei ceppi virali in una risoluzione più levata; come si verifica, ad esempio, ricorrendo all'epidemiologia molecolare in una situazione epidemica (Forth, et al., 2019).

Tuttavia, solo i genomi completi sono probabilmente in grado di mostrare una certa discriminazione e di dedurre fattori di virulenza. Anche le nuove varianti di ceppo con delezioni sono meglio identificate dal sequenziamento dell'intero genoma (Zani, et al., 2018).

Elusione dall'immunità innata

Inibizione della produzione o delle funzioni dell'interferone (IFN)

Gli IFN (interferoni) presentano grandi differenze nella struttura, nella distribuzione dei recettori e nelle attività biologiche tessuto-specifiche, ma tutte possono indurre uno stato antivirale (Boxel-Dezaire, et al., 2006). In particolare, le IFN di tipo 1 (IFN-1) rappresentano una delle prime linee di difesa per limitare la replicazione e la diffusione virale inducendo molteplici proteine antivirali che interferiscono con ogni fase del ciclo vitale virale, contribuendo così alla protezione degli ospiti dalle infezioni.

Quando un virus infetta gli ospiti, vari recettori di riconoscimento dei pattern (PRR, *Pattern Recognition Receptors*), inclusi i recettori *Toll-like* (TLR, *Toll-Like Receptor*), i recettori RIG-I-like (RLR) e i sensori citoplasmatici del DNA, riconoscono i pattern molecolari associati ai patogeni (PAMP) e provocano l'attivazione di vie di segnalazione immunitarie innate per produrre citochine pro-infiammatorie e IFN-1 (Zhu, et al., 2019).

I virus, che si sono coevoluti con i loro ospiti, sviluppano strategie per contrastare le cascate di segnalazione del sistema IFN e garantire la loro replicazione. Studi recenti, hanno dimostrato che ceppi virulenti di ASFV possono sopprimere l'espressione di IFN e così pure geni stimolati da IFS (ISG) nelle cellule infette.

Tra le proteine ASFV, la famiglia multi-genica 360 (MGF360), MGF530/505, pI329L, pDP96R, pE120R e pI215L ha dimostrato di inibire le risposte IFN-1 (Dixon, et al., 2013).

Nelle Figura-2 si evidenzia il meccanismo di inibizione della produzione o funzioni di IFN da parte di proteine ASFV mostrate come puntini rossi.

ASFV pMGF360-12L lega competitivamente la proteina di trasporto nucleare KPNA2, KPNA3 e KPNA4 con NF- κ B, inibendo così la traslocazione nucleare di NF- κ B e la produzione di IFN- β . pMGF360-15R (pA276R) sopprime l'espressione di IFN- β prendendo di mira IRF3. pI329L compete con TLR3 per la proteina adattatrice TRIF per inibire la produzione di IFN-I.

pDP96R influenza la segnalazione NF- κ B mediata da cGAS/STING bloccando l'attivazione di TBK1 e IKK β . pE120R interagisce con IRF3 e interferisce con il reclutamento di IRF3 in TBK1, che a sua

volta sopprime la fosforilazione di IRF3 per ridurre la produzione di IFN- β . pI215L interagisce con l'ubiquitina ligasi RNF3 E138 e promuove RNF138 per degradare RNF128.

E questo si traduce in una ridotta poliubiquitinazione (etichetta che segnala il destino degradativo di una proteina) legata a K63 della produzione di TBK1 e IFN β . pMGF505-7R facilita la degradazione di STING promuovendo l'espressione di ULK1 e blocca la traslocazione nucleare IRF3 per regolare negativamente la via di segnalazione cGAS-STING.

Inoltre, pMGF505-7R inibisce anche la via di segnalazione IFN- γ sopprimendo JAK1 e JAK2.

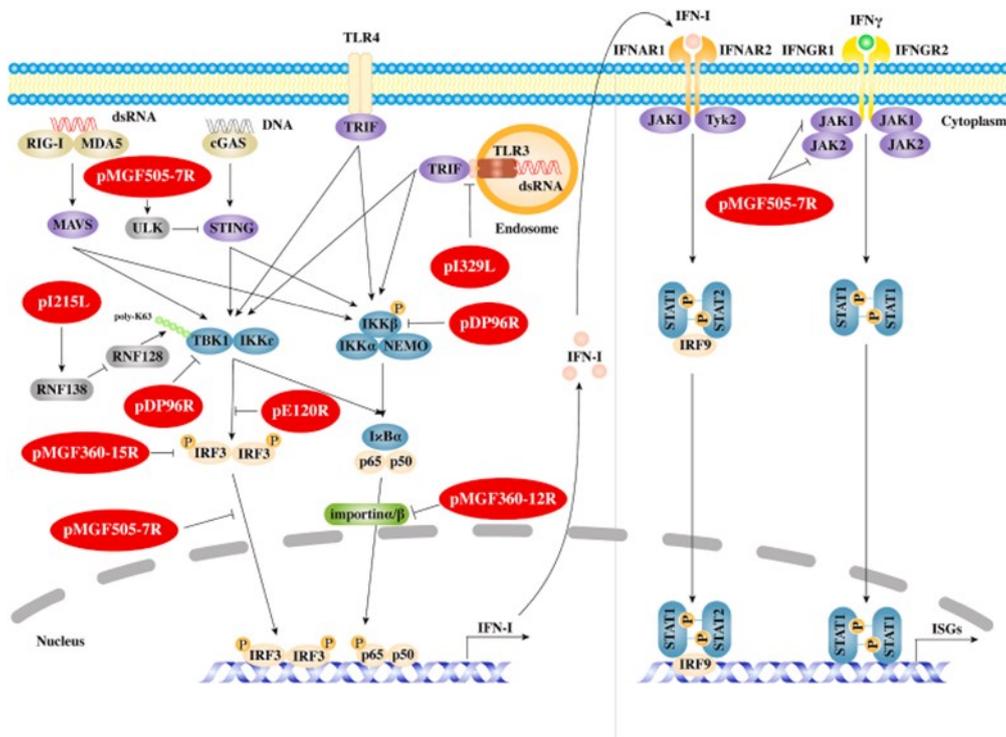


Figura 2-inibizione della produzione o delle funzioni IFN da parte del virus della peste suina africana (ASFV) (Zheng, et al., 2022).

Infezione, mantenimento e trasmissione di ASFV

Ornithodoros Zecche morbide

Il genere *Ornithodoros* di zecche molli della famiglia *Argasidae* funge da vettore biologico e ospite serbatoio per ASFV. Ad oggi, otto specie di *Ornithodoros* sono state dimostrate quali vettori competenti per l'ASFV (Golnar, et al., 2019).

Le zecche molli *Ornithodoros porcinus porcinus* infettate da ASFV (spesso indicate come *O. moubata porcinus* o *O. moubata*) in Africa sono state ben documentate e sono state inventate ed identificate anche in Madagascar (Ravaomanana, et al., 2010). Inoltre, i vettori *Ornithodoros* competenti sono presenti anche in alcune regioni dell'Europa e delle Americhe. Le zecche morbide di *Ornithodoros erraticus* (noto anche come *O. maroccanus*) abitano la penisola iberica e le aree mediterranee dell'Africa e dell'Asia, e sono stati un importante vettore serbatoio per ASFV in Portogallo e Spagna durante l'epidemia di PSA nel ventesimo secolo (Boinas, et al., 2011).

Queste zecche hanno una vita piuttosto lunga e l'ASFV può replicarsi a titoli elevati ed essere mantenuto per lunghi periodi di tempo nel vettore con effetti istopatologici minimi senza determinare un aumento della mortalità delle zecche (Kleiboeker, et al., 1998); sebbene, in letteratura, vengano riportati anche tassi di mortalità aumentati.

La trasmissione dell'ASFV ai suini da parte della zecca molle infetta è stata dimostrata fino a 588 giorni dopo l'infezione e la persistenza dell'ASFV è stata dimostrata per almeno 5 anni nelle zecche *O.erraticus*. Tuttavia, è stata osservata una clearance virale dopo un anno. In ogni caso, l'adattamento virus-zecca è probabilmente necessario per ottenere titoli virali elevati (Hess, et al., 1989).

Studi sull'infezione da ASFV e sulla replicazione nelle zecche molli mostrano come l'infezione da ASFV necessiti di 15-21 giorni per raggiungere l'epitelio intestinale medio in cui viene avviata la replicazione virale, con il picco di titoli virali raggiunto entro 28 giorni dall'infezione (Kleiboeker, et al., 1998).

Per una trasmissione di successo, è necessaria la replicazione di ASFV nelle ghiandole coxali (organi deputati all'escrezione localizzati in alcuni segmenti del cefalotorace) e nelle ghiandole salivari che, di solito, si ottiene entro 48 giorni dall'avvenuta infezione (Kleiboeker, et al., 1998).

All'interno del ciclo di vita delle zecche, l'ASFV può essere trasmessa sessualmente da maschio a femmina (Endris, et al., 1994), trans-ovaricamente da femmina infetta a prole e mantenuta trans-stadialmente attraverso le varie fasi della vita (Endris, et al., 1991).

Un aumento dei tassi di mortalità nelle zecche infette da ASFV è stato riportato durante le prime tre ovodeposizioni.

Trasmissione di ASFV

In Europa, Asia e Africa, l'ASFV è facilmente trasmissibile tra suini domestici attraverso il contatto diretto e prodotti a base di carne suina contaminata e fomite (Figura 3) (Gaudreault, et al., 2020):

- (A) In Europa e in Asia, la trasmissione bidirezionale tra suini e verri può avvenire all'interfaccia tra bestiame e fauna selvatica, specialmente dove esiste una scarsa biosicurezza negli allevamenti. La trasmissione tra cinghiali è in grado di mantenere e diffondere il virus in vaste aree geografiche.
L'ASFV può essere trasmesso tra le zecche molli del complesso *Ornithodoros erraticus* e i suini domestici, e le zecche molli possono fungere da serbatoi persistenti per il virus come visto nella penisola iberica. Ci sono poche prove a sostegno della trasmissione tra zecche molli e cinghiali eurasiatici e maiali domestici nelle epidemie europee e asiatiche contemporanee.

- (B) Il ciclo silvestre in Africa comporta la trasmissione del virus tra giovani facoceri (*Phacochoerus africanus*) e zecche molli del complesso *Ornithodoros moubata*.
Le zecche infette trasmettono ASFV ai giovani facoceri quando assumono un pasto di sangue e le zecche non infette sono infette dopo essersi nutrite di facoceri giovanili viremici, mentre i facoceri adulti in genere non mantengono alti livelli di viremia e sono ospiti senza uscita.

- (C) All'interno delle zecche molli dei complessi *O. moubata* e *O. erraticus*, il virus viene trasmesso per via sessuale e transovarica e può essere mantenuto in più fasi della vita

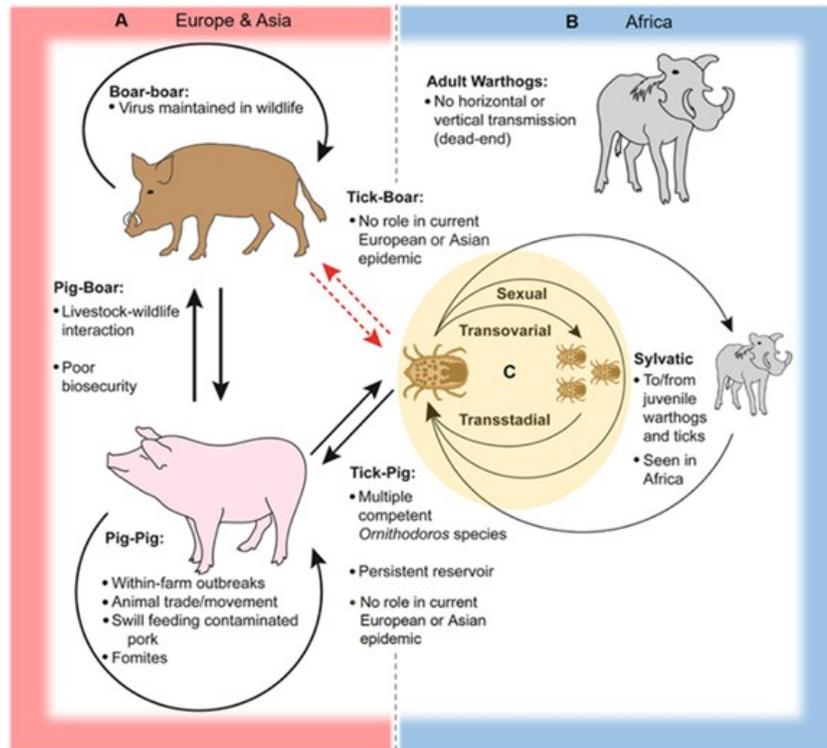


Figura 3-Schema dei cicli di trasmissione ASFV (Gaudreault, et al., 2020).

Ciclo silvestre di ASFV

In Africa, l'ASFV è principalmente mantenuta in un ciclo silvestre tra zecche molli di *Ornithodoros* e facoceri (*Phacochoerus africanus*); fondamentale è il fatto che i facoceri diventano si viremici ma non sviluppano malattia clinica dopo l'infezione da ASFV (Penrith, et al., 2019).

Il ciclo silvestre è stato documentato principalmente per i paesi dell'Africa meridionale e orientale (Penrith, et al., 2019). I giovani facoceri che vivono nelle tane vengono infettati da zecche molli che trasportano il virus e la trasmissione alle zecche avviene quando le zecche compiono un pasto di sangue dai giovani facoceri viremici (Plowright, et al., 1969); (Figura 2).

È stato ampiamente dimostrato come, titoli di sangue di facocero ASFV di almeno 103 HAD50 (*hemoadsorbing doses 50% per millilite*) /mL siano necessari per infettare le zecche che si stanno nutrendo; inoltre si è riscontrato che, in genere, questo ciclo eziopatogenetico si ottiene solo nei giovani facoceri rispetto agli adulti che raramente presentano titoli ASFV superiori a 102 HAD50/mL (Jori, et al., 2009).

Anche altri suidi selvatici in Africa come nel caso dei maiali selvatici (potamocero, *Potamochoerus larvatus*) possono infettarsi e trasmettere ASFV, ma si considera svolgano un ruolo minore rispetto

ai facoceri nel ciclo silvestre poiché i loro comportamenti sono meno favorevoli alle interazioni con zecche molli (Penrith, et al., 2019).

Trasmissione zecca-suino (*Sus scrofa domesticus* e *Sus scrofa*)

Le zecche molli di *Ornithodoros*, comprese le specie del complesso *O. moubata* in Africa e *O. erraticus* in Europa sono in grado di trasmettere ASFV ai suini domestici (*Sus scrofa domesticus*) e possono infettarsi dopo essersi nutrite di animali viremici (Kleiboeker, et al., 1998) (Figura 3).

In Africa e Madagascar, zecche infette del complesso *O. moubata* sono state isolate da porcili e allevamenti in luoghi colpiti da focolai di PSA, compresi i siti in cui si verifica raramente o per nulla alcun contatto tra suini selvatici e domestici, suggerendo un ruolo rilevante per le zecche molli nel mantenimento della malattia in queste aree (Wilkinson, et al., 1988).

Un modello simile è stato osservato anche nella penisola iberica, dove le zecche di *O. erraticus* sono state associate alla persistenza di ASFV (Boinas, et al., 2011).

In ogni caso, è assai improbabile che un ciclo di zecche molli svolga un ruolo significativo nell'epidemia in corso in Europa e molto probabilmente anche in Asia, poiché le zecche molli sono in gran parte assenti nell'Europa centrale e nelle nazioni baltiche e la maggior parte delle specie di zecche molli nell'Europa orientale e nella regione del Caucaso non infestano i suini domestici e selvatici (Frant, et al., 2017).

Infezione da ASFV nei suini domestici

L'infezione da ASFV può produrre una varietà di manifestazioni cliniche che vanno dalla malattia cronica, subclinica o di basso livello alla febbre emorragica e alla morte improvvisa (*mors peracuta*), a seconda del ceppo virale e della suscettibilità intrinseca dell'ospite (Blome, et al., 2013).

Studi effettuati su isolati di genotipo II eurasiatico altamente virulenti hanno prodotto tassi di mortalità prossimi al 100% nei suini domestici e nei cinghiali e risultano associati ad un quadro clinico che progredisce rapidamente a partire da una sintomatologia clinica assolutamente aspecifica (Gabriel, et al., 2011).

Trasmissione suino-cinghiale domestico

I suini domestici trasmettono prontamente l'ASFV ad altri suini sensibili e focolai di ceppi virulenti mostrano alti livelli di morbilità e mortalità (Costard, et al., 2013). Il contatto diretto con suini infetti diffonde efficacemente la malattia ad altri suini selvatici e domestici (Costard, et al., 2013). Tuttavia, sono stati osservati diversi livelli di efficienza di trasmissione per ceppi ad alta, moderata e bassa virulenza, probabilmente a causa di differenze nei livelli di viremia e diffusione del virus (Boinas, et al., 2004). Sangue, fluidi corporei, feci e carcasse di suini infetti giocano un ruolo determinante come vie indirette di infezione.

Gli animali che guariscono dall'infezione con ceppi caratterizzati da virulenza bassa o moderata possono diventare portatori subclinici potenzialmente in grado di diffondere il virus ad altri suini (Guinat, et al., 2016) Il movimento illegale di suini infetti da parte di produttori o prodotti a base di carne suina (proveniente da soggetti infetti) ha svolto un ruolo significativo nelle epidemie di PSA in Africa, Europa e Asia (Gogin, et al., 2013).

I cinghiali selvatici eurasiatici sono altamente sensibili agli isolati virulenti di ASFV di genotipo II circolanti in Europa (Gabriel, et al., 2011), e il contatto tra cinghiali infetti e suini domestici è stato un fattore che ha contribuito in modo significativo alla diffusione dell'ASFV nell'Europa orientale, nel Caucaso e nella Federazione Russa, aree geografiche nelle quali sono comuni allevamenti di suini da cortile su piccola scala gestiti con scarsi o assenti livelli di biosicurezza (Gogin, et al., 2013)

L'ASFV è stato rilevato nei cinghiali selvatici in tutta l'Europa orientale e centrale e fino al Belgio occidentale. L'esistenza di una popolazione di suini selvatici geograficamente diffusa in cui l'ASFV

può circolare rappresenta una sfida significativa per il controllo delle malattie e gli sforzi di eradicazione (Linden, et al., 2019).

Altre modalità di trasmissione

ASFV è stabile in condizioni ambientali estreme, consentendo di essere facilmente diffuso e trasmesso. Le modalità di trasmissione diverse dal contatto diretto con suini, tessuti, carcasse o morsi infetti di zecche molli infette comprendono l'importazione di prodotti a base di carne suina infetti e la contaminazione di fomite quali mangimi, attrezzature, veicoli e indumenti.

L'ASFV può rimanere vitale in una varietà di ingredienti per mangimi animali in una serie di condizioni ambientali, comprese quelle caratteristiche delle rotte marittime transatlantiche, ed è stata dimostrata sperimentalmente un'efficiente trasmissione delle malattie attraverso liquidi contaminati da ASFV e mangimi per animali a base vegetale.

Il movimento di prodotti a base di carne suina contaminata e l'alimentazione dei suini domestici sono stati importanti fattori epidemiologici nei focolai di ASFV nel Caucaso e nella Federazione Russa, nonché nella comparsa della malattia in Cina (Gaudreault, et al., 2020).

CAPITOLO 3- Presentazione clinica e valutazione anatomo-patologica macroscopica dell'infezione da ASFV (African swine fever) nei suini domestici

I fattori di virulenza, le interazioni ospite-virus e la patogenesi della maggior parte dei genotipi di ASFV sono ancora lontani dall'essere compresi. Questa mancanza di conoscenza ostacola la ricerca mirata sui meccanismi di base per la protezione dalle malattie e sulla progettazione di vaccini. Finora, la maggior parte degli studi si è concentrata sulla comprensione di come gli isolati di ASFV di genotipo I e II, gli unici genotipi che si sono diffusi al di fuori dell'Africa fino ad oggi, colpendo i suini domestici (Sanchez-Cordon, et al., 2019).

Dall'epidemia di genotipo II in Georgia nel 2007, sono stati condotti diversi studi cercando di comprendere le dinamiche di infezioni causate da particolari isolati presenti in Europa orientale e centrale. La caratterizzazione biologica di tali isolati è stata effettuata su suini domestici e, in misura minore su cinghiali mediante esperimenti nei quali sono state testate diverse vie di infezione (infezione intramuscolari, intranasali e da contatto), utilizzando diverse dosi infettanti (Sánchez-Cordón, et al., 2019).

Ed è per questo che comprendere la patogenesi della PSA può aiutare a prevedere il decorso della malattia, gettando le basi per lo sviluppo di specifici vaccini e appropriati interventi terapeutici (Sánchez-Vizcaíno, et al., 2019)

La presentazione clinica e le lesioni patologiche macroscopiche della PSA ne suini domestici (*Sus scrofa*) possono variare a seconda della virulenza del ceppo, della via e della dose infettante e infine delle caratteristiche dell'ospite come, ad esempio, l'età e il *background* immunologico degli animali (Sanchez-Vizcaino, et al., 2015). Tutti i ceppi di ASFV mostrano un'elevata morbilità a causa dell'elevata efficienza della trasmissione virale, il periodo di incubazione varia da 2 a 5 giorni nelle infezioni oronasali sperimentali mentre si attesta tra 5 e 7 giorni nei casi di infezione naturale nelle forme cliniche acute o subacute (Mebus, 1988).

Gli isolati di ASFV possono essere classificati come altamente virulenti, moderatamente virulenti e a bassa virulenza (Pan, et al., 1984). I decorsi clinici osservati nella PSA nei suini domestici possono essere descritti come iperacuti, acuti, subacuti o cronici.

PSA iperacuta: segni clinici e lesioni

I ceppi altamente virulenti sono tipicamente responsabili di questo decorso clinico, caratterizzato da febbre alta, fino a 42°C, anoressia, letargia e talvolta morte improvvisa senza segni evidenti di malattia. Questo andamento epidemiologico si osserva spesso quando il virus entra in un allevamento causando la morte di alcuni animali prima dell'esplosione di casi clinici.

Alcuni animali possono mostrare difficoltà respiratoria a causa della febbre alta, tuttavia, solitamente non si riscontrano lesioni macroscopiche all'esame post mortem (Salguero, 2020).

PSA acuta: segni clinici e lesioni

Questa forma clinica è causata da isolati altamente o moderatamente virulenti, ed è il decorso tipico, molto rapido, osservato negli allevamenti naïve dopo la segnalazione dei primi casi fatali. Il decorso clinico è caratterizzato da febbre elevata, con temperatura variabili tra i 40 e i 42°C, letargia, anoressia e inattività. Gli animali colpiti tendono a raggrupparsi.

Molti animali infetti mostrano una cianosi centripeta, facilmente riscontrabile nelle orecchie, sul muso e negli arti, nell'addome coda ed area perianale. Solitamente si osserva distress respiratorio, con edema polmonare grave in animali affetti da isolati altamente patogeni (Carrasco, et al., 2002). Le lesioni cutanee sono frequenti, con presenza di emorragie petecchiali o ecchimosi.

Altri segni clinici possono includere secrezioni nasali, a volte macchie di sangue (epistassi), vomito e diarrea, che possono contenere sangue, determinando la presenza di macchie di colore nerastro nella zona perianale dell'animale. Gli aborti possono verificarsi nelle scrofe gravide e i tassi di mortalità possono raggiungere anche il 100% negli allevamenti colpiti entro 7 giorni dall'insorgenza della malattia (Salguero, 2020).

All'esame post *mortem*, la lesione più caratteristica della PSA acuta è la splenomegalia emorragica (Konno, et al., 1972), con milza molto ingrossata (splenomegalia), di colore scuro e friabile al sezionamento che occupa un ampio spazio all'interno della cavità addominale. La seconda lesione più importante descritta nella PSA acuta è una linfadenite emorragica multifocale.

I linfonodi possono presentare emorragie multifocali o estese che vanno a definire un aspetto tipicamente marmorizzato. I linfonodi più colpiti sono quelli gastroepatici, renali e altri linfonodi addominali come ileocecale e mesenterico. Le emorragie possono anche essere osservate con minore frequenza in altri linfonodi, come sottomandibolare, retrofaringeo o inguinale.

Le emorragie petecchiali si osservano spesso sulla superficie renale e in fase di sezionamento. Si possono osservare anche altre lesioni, per lo più emorragie nella muscosa o nella sierosa di altri organi, come l'intestino crasso e tenue, l'epicardio nel cuore o la vescica urinaria (Mebus, et al., 1979).

PSA subacuta: segni clinici e lesioni

Questa forma clinica è solitamente osservata in animali infettati da isolati moderatamente virulenti, con segni clinici simili a quelli osservati nella PSA acuta, sebbene normalmente meno marcati. I suini colpiti mostrano febbre da moderata ad alta mentre il tasso di mortalità varia dal 30-70%, con i suini che muoiono dopo 7-20 giorni dall'infezione (Sanchez-Vizcaino, et al., 2015).

I cambiamenti vascolari, per lo più emorragie ed edemi, nella forma subacuta della malattia possono essere più intensi della forma acuta (Gomez-Villamandos, et al., 1995).

La morte degli animali affetti da malattia può avvenire in due fasi diverse:

- Durante una trombocitopenia iniziale e leucopenia (Gomez-Villamandos, et al., 1995),
- Oppure durante una fase di recupero, osservata negli animali giovani, causando eritrodiapedesi indotta da forte ed intensa vasodilatazione (Gomez-Villamandos, et al., 1998).

All'esame post *mortem*, gli animali mostrano idropericardio, ascite e edema multifocale, molto caratteristici nella parete della cistifellea o nel grasso perirenale (Sanchez-Vizcaino, et al., 2015).

Alcuni animali possono mostrare splenomegalia emorragica come descritto per la forma acuta della malattia, ma molti animali mostreranno splenomegalia parziale, con chiazze di milza colpite ed altre aree indenni da segni alterativi. Una linfadenite emorragica multifocale può anche essere osservata con linfonodi multipli in tutte le aree del corpo che mostrano le emorragie e il tipico aspetto marmoreo (Gomez-Villamandos, et al., 2003).

Emorragie petecchiali possono anche essere osservate a livello renale. La polmonite multifocale si osserva anche con macchie di consolidamento e colore scuro nel polmone. Questa lesione può anche essere attribuita a infezioni secondarie riconducibili allo stato di immunosoppressione indotto da ASFV (Moulton JE, 1957).

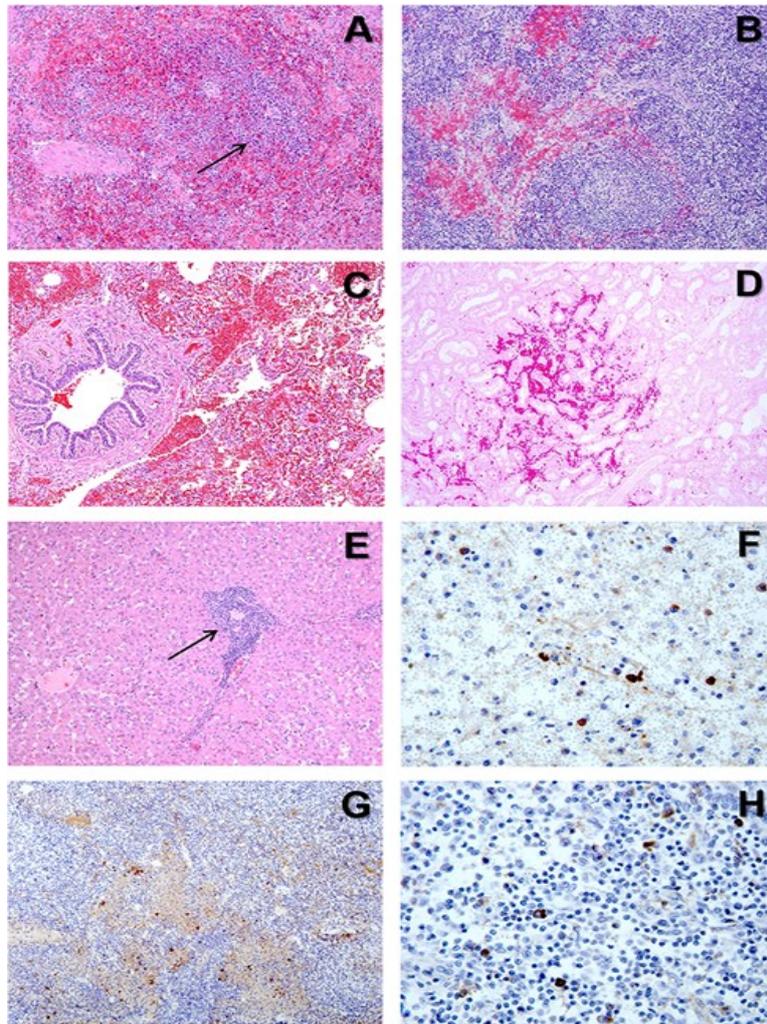


Figura 4- (A) Colorazione H & E della milza di un maiale con PSA acuta che mostra abbondanti globuli rossi all'interno della polpa rossa e grave deplezione linfoide, con follicoli linfoidi molto piccoli (freccia) nella polpa bianca.

(B) Colorazione H&E del linfonodo gastroepatico di un suino con PSA subacuta che mostra emorragie nel tessuto linfoide perifollicolare e nel midollo, insieme a una moderata deplezione linfoide. (C) Colorazione H & E del polmone di un maiale con PSA subacuta che mostra gravi emorragie nei setti e negli spazi alveolari.

(D) Colorazione H & E del rene di un maiale con PSA acuta che mostra emorragie interstiziali all'interno della corteccia renale. (E) Colorazione H&E del fegato di un maiale con PSA acuta che mostra infiltrati infiammatori periportal (freccia) composti da linfociti, macrofagi e plasmacellule.

(F) Rilevazione IHC di ASFV p72 nella milza che mostra una forte reazione positiva nei macrofagi nella polpa rossa e nei detriti cellulari all'interno delle aree necrotiche. (G) Rilevazione IHC di ASFV p72 nel linfonodo gastroepatico che mostra una forte reazione positiva nei macrofagi all'interno delle aree perifollicolari e del midollo. (H) Rilevazione IHC di ASFV p72 nelle tonsille che mostra una forte reazione positiva nei macrofagi all'interno delle aree perifollicolari. (Salguero, 2020)

PSA cronica: segni clinici e lesioni

Questa forma clinica è causata dall'infezione di isolati a bassa virulenza ed è osservata, piuttosto raramente, nella penisola iberica e nella Repubblica Dominicana (Sanchez-Vizcaino, et al., 2015).

È stato ipotizzato che questi isolati a bassa virulenza, e la forma cronica a loro associata, si sia evoluta a partire da isolati di ASFV impiegati nei primi studi sui vaccini effettuati nella penisola iberica all'inizio degli anni '60. L'evoluzione di isolati altamente e moderatamente virulenti in altre aree in cui il virus è stato osservato per lunghi periodi di tempo non ha prodotto questa forma cronica della malattia (Giammarioli, et al., 2011).

Questa forma clinica è caratterizzata da necrosi multifocale cutanea e artrite, ritardo della crescita, emaciazione, distress respiratorio e possibili forme abortive (Sanchez-Botija, 1982). Non si osservano cambiamenti vascolari nella forma cronica di PSA e molte lesioni osservate vengono associate ad infezioni batteriche secondarie, inducendo poliserosite fibrinosa, polmonite necrotica o cronica, necrosi cutanea, della lingua e delle amigdale (Moulton, et al., 1968).

Patogenesi della deplezione linfoide

La PSA è caratterizzata da una grave leucopenia, per lo più associata a linfopenia, e da uno stato generale di immunodeficienza (Sanchez-Vizcaino, et al., 1981). Inizialmente, il virus penetra per via oro-nasale in seguito al morso di una zecca molle infetta. Il virus replica inizialmente nelle tonsille o nei linfonodi (Greig, 1972), diffondendosi attraverso il sistema linfatico e sanguineo agli organi secondari di replicazione entro 2-3 giorni, e in seguito si diffonde al resto degli organi, dove il virus può replicare in un'ampia varietà di cellule (Heuschele, 1967).

Monociti e macrofagi rappresentano le principali cellule bersaglio per ASFV (Carrasco, et al., 2002). L'ASFV è un virus a DNA, ma la replicazione avviene all'interno del citoplasma e non a livello nucleare (Alcamiz, et al., 1990).

Il monocita o macrofago infetto appaiono gonfi, con marginazione della cromatina nucleare e mostrano un corpo di inclusione iuxtannucleare intra-citoplasmatico, identificabile dal suo tipico colore pallido nel momento in cui sezioni semisottili (1 micron) sono colorate con il colorante blu di toluidina. Questi corpi di inclusione mostrano “fabbriche” virali quando studiati al microscopio elettronico a trasmissione. La replicazione del virus induce necrosi nelle cellule infette e i virioni vengono rilasciati durante la gemmazione e possono essere osservati liberamente nel sangue, nella linfa e nel tessuto interstiziale (Sierra, et al., 1987).

La distruzione dei monociti e macrofagi nella PSA è stata attribuita a fenomeni apoptotici e necrotici. Il genoma dell'ASFV contiene geni coinvolti nella morte cellulare non programmata sia in modo inibitorio che induttivo (Brun, et al., 1996). Alcuni di questi geni possono promuovere la sopravvivenza delle cellule infette e l'apoptosi è stata descritta come la causa meno probabile di morte cellulare nella popolazione di monociti e macrofagi infetti (Alguero, et al., 2004).

La PSA è caratterizzata da una massiccia distruzione degli organi e dei tessuti linfoidei, tra cui milza, linfonodi, timo e tonsille; si riscontra una grande percentuale di linfociti B e T e macrofagi sottoposti a morte cellulare durante l'infezione acuta da ASFV (Oura, et al., 1998).

Si è osservato che la replicazione del virus nei monociti-macrofagi (Figura 4 F-H) induce un'attivazione in questa popolazione cellulare e un aumento della secrezione di citochine pro-infiammatorie nelle prime fasi della malattia (Salguero, et al., 2005).

“L'upregulation” (sovraregolazione) nell'espressione di citochine pro-infiammatorie, incluse IL-1, TNF-alfa e IL-6 e descritta come una “tempesta citochinica” (Moral, et al., 1999), costituisce il meccanismo responsabile della massiccia induzione dell'apoptosi nei linfociti limitrofi ai monociti-macrofagi infetti nei tessuti (Moral, et al., 1999).

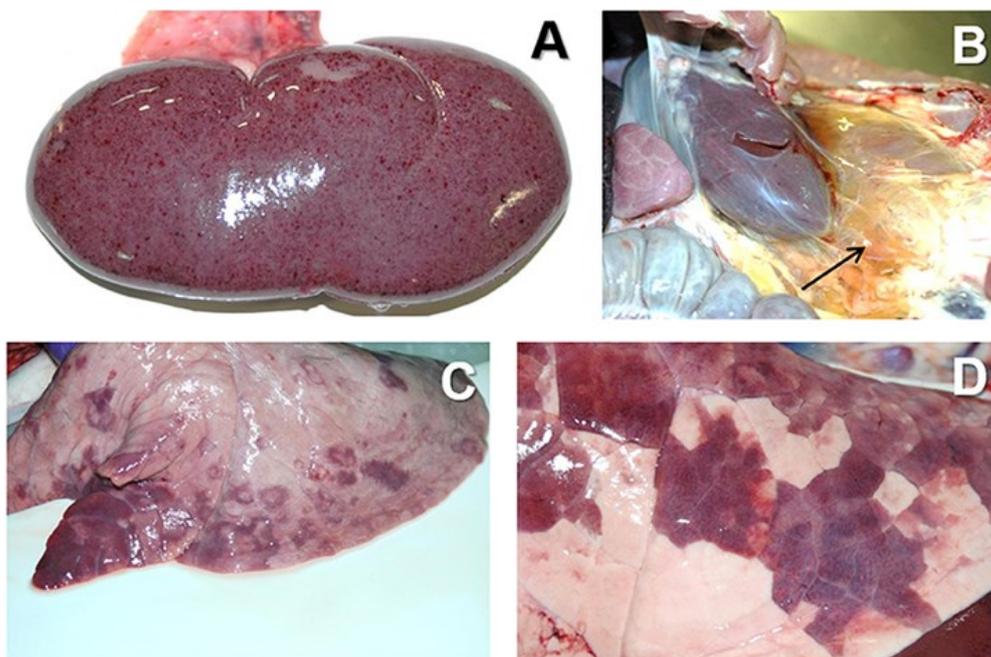


Figura5-(A) Emorragie petecchiali multiple nella superficie corticale del rene nella PSA acuta. (B) Edema perirenale grave (freccia) in un suino con PSA subacuta. (C) Aree multifocali di consolidamento polmonare ed edema polmonare nella PSA subacuta. (D) Polmonite multifocale con aree di colore scuro nel lobo diaframmatico del polmone nella PSA subacuta (Salguero, 2020).

Patogenesi dei cambiamenti vascolari

La PSA può essere considerata una febbre emorragica, con alcuni meccanismi patogenetici simili a quelli descritti per le classiche febbri emorragiche che colpiscono l'uomo, come l'infezione da Ebola o da filovirus Marburg (Smither, et al., 2013). Tra i tipici cambiamenti vascolari osservati nella PSA acuta, possiamo includere emorragie petecchiali ed ecchimotiche in più organi, splenomegalia emorragica o iperemica, edema polmonare e coagulopatia intravascolare disseminata (DIC: *Disseminated Intravascular Coagulation*). Nella PSA subacuta, possiamo anche osservare questi cambiamenti vascolari insieme a un edema più marcato, ascite e idropericardio.

La lesione più tipica della PSA è la splenomegalia emorragica o iperemica (Konno, et al., 1972). La gravità di questa lesione varierà a seconda della virulenza dell'isolato. L'aspetto istopatologico della milza includerà una polpa rossa iperemica, che può essere completamente riempita di globuli rossi (Figura 5), trombi piastrinici e detriti cellulari, producendo una rottura della normale architettura dell'organo (Carrasco, et al., 1997).

La necrosi dei macrofagi nella polpa rossa è seguita da una perdita di giunzioni intercellulari con le cellule muscolari lisce e dall'esposizione della lamina basale, inducendo l'attivazione della cascata della coagulazione, dell'aggregazione piastrinica e della deposizione di fibrina, dando luogo all'accumulo di globuli rossi all'interno dei cordoni splenici (Gomez-Villamandos JC, 1996).

Le emorragie sono molto comuni nelle ultime fasi della malattia, soprattutto in organi senza una popolazione permanente di macrofagi vascolari, come i linfonodi renali e gastroepatici o il rene stesso (Figura 5 B, D). Anche se l'ASFV può replicarsi nelle cellule endoteliali, questo fenomeno non è stato osservato in tutti gli organi che mostrano emorragie (Figura 5C), e cosa più importante, questa replicazione virale è stata riportata solo nelle cellule endoteliali nelle ultime fasi della malattia, mentre le emorragie possono verificarsi in fasi precedenti (Gomez-Villamandos, et al., 1995).

Un diverso meccanismo patogenetico è stato osservato e proposto come uno dei principali fattori che contribuiscono alle emorragie nelle prime fasi della malattia: l'attivazione fagocitaria delle cellule endoteliali capillari, seguita dall'ipertrofia delle cellule endoteliali che può portare all'occlusione totale del lume capillare e ad un forte aumento della pressione intravascolare. La successiva perdita di cellule endoteliali determina l'esposizione della membrana basale capillare a cui le piastrine possono aderire, indurre l'attivazione del sistema di coagulazione e indurre il DIC (Gomez-Villamandos, et al., 2013).

La patogenesi dell'edema polmonare inizia con la grave infezione dei macrofagi intravascolari polmonari (PIMs: *Pulmonary Intravascular Macrophages*), che è la principale cellula bersaglio dell'ASFV nel polmone (Carrasco, et al., 1996). La produzione di citochine pro-infiammatorie quali IL-1 alfa e TNF-alfa inducono attività chemiotattica ed aumentano la permeabilità endoteliale, determinando la fuoriuscita di liquido nei setti inter-alveolari e negli spazi alveolari (Carrasco, et al., 2002).

La marcata anoressia degli animali infetti riduce drasticamente l'assunzione di cibo/proteine e accelera la presenza di edema ipo-oncotico che induce consumo di grasso interno, ascite, idrotorace e idropericardio, quadri tipici della PSA subacuta. Inoltre, il fegato degli animali infetti mostra una marcata congestione, ma anche lesioni istopatologiche, tra cui infiltrati infiammatori (Figura 4 E), infezioni delle cellule di Kupffer che mostrano una grave attivazione secretoria, ed epatociti nelle ultime fasi della malattia. Anche il malfunzionamento epatico stesso può contribuire allo sviluppo dell'edema multifocale (Cordon, et al., 2008).

In una recente ricerca condotta da Sang-Ik (Sang-Ik, et al., 2022) sono stati studiati e valutati in modo comparativo ed analitico i cambiamenti dei parametri ematici, cariche virali e lesioni patologiche nei suini infettati sperimentalmente con il ceppo VUNA/HY/Vietnam ASFV, raggruppati in seguito al momento della morte dopo l'insorgenza della viremia.

È interessante notare come i suini del gruppo I, siano morti dopo 2-5 giorni dall'infezione, presentassero una carica virale più elevata nel sangue rispetto a suini del gruppo II, che inoltre, andavano incontro a morte a 6-7 giorni dall'infezione. Sebbene tutti i suini in questo studio siano stati infettati con la stessa dose di ASFV, nel momento iniziale dell'infezione è stata osservata una carica virale diversa nel sangue.

La discrepanza della suscettibilità virale in ciascun suino può spiegare questi risultati, perché la gravità di ASFV è nota per differire in base alla predisposizione individuale dell'ospite (secondo la classica logica epidemiologica della triade). Nel complesso, questi risultati suggeriscono che la carica virale iniziale nel sangue dei suini infetti rappresenta un fattore importante nel determinare la gravità del decorso clinico e il tempo necessario al raggiungimento della morte del soggetto.

Patogenesi nel cinghiale euroasiatico

Il cinghiale euroasiatico (*Sus scrofa*) è una specie suide autoctona in gran parte dell'Europa e dell'Asia e del Nord Africa, ma è stato introdotto anche in altri continenti, tra cui diverse isole. È considerato l'antenato naturale del maiale domestico ed entrambi sono classificati come appartenenti alla stessa specie. Allo stato attuale, il cinghiale svolge un ruolo estremamente significativo nella diffusione dell'infezione da PSA in Europa, e probabilmente anche in Asia, essendo anche considerato la principale fonte di infezione nei recenti focolai in Europa centrale e orientale (Schulz, et al., 2019).

A causa della stretta relazione tassonomica tra cinghiale euroasiatico e suini domestici, si possono osservare parecchie somiglianze, in termini di risposte immunitarie, alle infezioni. Tuttavia, anche se appartengono alla stessa specie (*Sus scrofa*), fanno parte di sottospecie diverse (Sanchez-Cordon, et al., 2019).

Inoltre, i suini domestici, e in alcuni casi anche i cinghiali, sono gestiti con uno stretto controllo sanitario, riproduttivo e nutrizionale; mentre i cinghiali selvatici sono soggetti a numerose variazioni naturali delle condizioni riproduttive, sanitarie e alimentari. Inoltre, riconosciamo importanti differenze genetiche e i cinghiali, in natura, mostrano aggressività intraspecifica, veicolano un carico patogeno misto (assetto microbiotico complesso) e soffrono di periodi di stress, che possono compromettere la funzionalità del loro sistema immunitario. Tutti insieme questi fattori possono influenzare l'esito dell'infezione da ASFV nei cinghiali (Sanchez-Cordon, et al., 2019).

Ad oggi, i riscontri delle lesioni anatomo-patologiche macroscopiche a varia profondità di dettaglio esistono in gran parte solo per i suini domestici infettati sperimentalmente da ASFV e meno frequentemente per i cinghiali, il che è dovuto principalmente al limitato accesso ai cinghiali selvatici e alle difficoltà associate al loro mantenimento in condizioni sperimentali. Inoltre, i dati istopatologici ottenuti da sperimentazioni condotte sugli animali sono molto difficilmente disponibili in ragione della complessità e del rigore proprio della legislazione in materia di sperimentazione animale (Sehl, et al., 2020).

Molto recentemente sono stati pubblicati i primi tre rapporti riguardanti suini domestici naturalmente infettati da ASFV da un focolaio in Vietnam, riportando i risultati clinici e anatomo-patologici dei suini che sono deceduti come pure di quelli sopravvissuti (Pornthummawat, et al., 2021) descrivendo le lesioni associate alla PSA. Al contrario, le descrizioni dei reperti patologici di cinghiali selvatici deceduti in seguito all'infezione in condizioni di campo sono completamente mancanti, sebbene queste specie animale sia di grande rilevanza nel mantenimento e nella diffusione dell'ASFV in Europa.

Ulteriori studi sono stati condotti su cinghiali con isolati a bassa e alta virulenza in diversi contenuti e condizioni. Isolati altamente patogeni del genotipo II inducono splenomegalia emorragica (iperemica, linfadenite emorragica, edema polmonare ed emorragie petecchiali multifocali, talvolta descritte come ancora più gravi che nel suino domestico (Pikalo, et al., 2019).

Anche la mortalità sembra essere estremamente elevata (90-100%) in questi animali infetti. Tuttavia, esistono varianti attenuate del genotipo II circolanti in alcune parti d'Europa (Nurmoja, et al., 2017). I cinghiali selvatici infetti con isolati a bassa virulenza e sopravvissuti all'infezione possono trasmettere il virus ad altri soggetti per mesi, sebbene gli attuali isolati di genotipo II non emoadsorbenti sembrano non indurre portatori a lungo termine (Pikalo, et al., 2019).

Quindi, la diversità e le dimensioni delle lesioni associate all'ASFV in campo sono scarsamente rappresentate sollecitando indagini più approfondite (Velazquez-Salinas, et al., 2022).

Mentre gli sforzi per il controllo della malattia, in particolare l'aumento della biosicurezza e della professionalizzazione dell'industria suina, sono riusciti a ridurre l'incidenza della PSA nei suini domestici, la popolazione di cinghiali selvatici rappresenta un serbatoio sostanziale in Europa e probabilmente anche in Asia, che ostacolerà l'eradicazione e servirà come fonte per un'ulteriore espansione geografica (Gavier-Widén, et al., 2015).

I suini infetti da ASFV solitamente sviluppano viremia 4-8 giorni dopo l'inoculazione. Considerando l'assenza di anticorpi completamente neutralizzanti, la viremia potrebbe persistere per settimane o mesi (Sánchez-Vizcaíno, et al., 2019).

I primissimi studi hanno dimostrato che nelle infezioni naturali e nelle infezioni sperimentali per via intra-nasale, l'ASFV penetra preferibilmente attraverso le tonsille o la mucosa faringea dorsale e quindi si estende ai linfonodi mandibolari o retrofaringei. Dopo un'estesa replicazione nei tessuti linfoidi, l'ASFV si diffonde in tutto il corpo tramite fluido linfatico o sangue (Sanchez-Cordon, et al., 2019).

I risultati delle sperimentazioni sia nei suini domestici che nei cinghiali selvatici hanno evidenziato variabilità relativamente agli esiti sperimentali e alla gravità dei segni dopo infezioni sperimentali con gli isolati di genotipo II di ASFV attualmente circolanti in Europa, possibilmente al di sopra della variabilità biologica attesa, e attribuibile ai diversi contesti sperimentali.

Nella maggior parte delle infezioni sperimentali con isolati di genotipo II, cinghiali di diverse età hanno mostrato un'elevata suscettibilità all'ASFV e allo sviluppo della malattia. In diversi studi la suscettibilità era persino superiore a quella mostrata nei suini domestici della stessa età.

Tali differenze nel decorso e nella gravità dell'infezione da ASFV e nello sviluppo della malattia tra suini domestici e cinghiali selvatici possono suggerire sottili differenze nei meccanismi patogenetici e immunologici tra le due sottospecie che soltanto studi futuri dovrebbero chiarire, in modo da poter identificare non solo le differenze biologiche con i suini domestici, ma anche valutare ulteriori differenze tra l'infezione sperimentale e naturale da ASFV nei cinghiali (Sanchez-Cordon, et al., 2019).

Attualmente non vi sono vaccini in commercio per prevenire la PSA nei suini. Pertanto, il controllo dei focolai di PSA dipende da una diagnosi rapida e accurata da parte dei veterinari e del monitoraggio dei suini sani (Chen, et al., 2020).

ASFV in facoceri africani e maiali selvatici

In Africa orientale, l'ASFV è mantenuto in un antico ciclo silvestre che coinvolge il facocero comune (*Phacochoerus africanus*) e la zecca molle *Ornithodoros moubata*, che è il vettore artropode che popola le loro tane (Dixon, et al., 2019).

Fin dai primi studi sperimentali, è stato dimostrato che i facoceri erano molto resistenti all'infezione da ASFV, non mostrando segni clinici della malattia, tranne che negli animali giovani che sviluppano una viremia transitoria (Thomson, 1985). La viremia nei facoceri adulti è molto rara, per lo più limitata ai linfonodi (Netherton, et al., 2019). L'ASFV può persistere nei tessuti del facocero fino a 25 settimane dopo l'infezione, ma solitamente viene eliminato entro 56 settimane, il che potrebbe spiegare la ripetuta reinfezione dei facoceri da parte di zecche con lo stesso ceppo virale (Netherton, et al., 2019) (Netherton, et al., 2019).

Diverse differenze genetiche sono state descritte tra facoceri e suini domestici. Una differenza tra tolleranza alle infezioni e patologia grave può essere dovuta ad una variante polimorfica RELA (p65; v-rel reticuloendoteliosi) dell'omologo virale dell'oncogene A trovata nei facoceri (Palgrave, et al., 2011).

L'ASFV è stato isolato anche nei maiali selvatici (*Potamochoerus larvatus*) e nei maiali rossi di fiume (*Potamochoerus porcus*), specie di suidi selvatici che si trovano nell'Africa occidentale e centrale sub-sahariana. L'infezione da ASFV non induce segni clinici in questa specie, ma si può osservare una moderata viremia. L'ASFV può replicarsi nei tessuti senza causare lesioni istopatologiche e per lo più limitata alle aree dei linfociti B dei linfonodi.

Gli animali infetti possono trasmettere l'ASFV tramite il pasto di sangue della zecca ma anche tramite contatto, anche se il loro ruolo nel mantenimento epidemiologico dell'ASFV come serbatoio non è chiaro poiché queste specie non vivono in tane come i facoceri e non sono a stratto contatto con le zecche *Ornithodoros spp* (Netherton, et al., 2019).

CAPITOLO 4- Situazione epidemiologica mondiale

La peste suina africana (PSA) è stata descritta per la prima volta da Montgomery in Kenya nel 1921 e rappresenta una delle più importanti malattie virali che colpiscono il comparto suinicolo, principalmente in ragione delle significative conseguenze sanitarie e socioeconomiche. Per questo motivo, è elencata come malattia soggetta a notifica dall'Organizzazione Mondiale della Sanità Animale (*World Organisation for Animal Health* fondata come OIE); la peste suina africana ha diverse caratteristiche che la rendono difficile da controllare ed eradicare.

L'incidenza della PSA non è solo aumentata nel continente africano negli ultimi 15 anni, tanto che ora ne sono colpiti anche i paesi dell'Africa occidentale come Mauritius e Madagascar, ma ha raggiunto anche nuove aree, quali ad esempio la regione del Caucaso nel 2007. In effetti, la rapida diffusione della malattia nel continente europeo e la situazione incontrollata nella Federazione Russa espongono tutti i paesi ad un grande rischio in ragione dell'intenso commercio globale (globalizzazione come determinante di salute). La vicinanza di alcune zone colpite ai confini dell'Unione Europea ha aumentato le preoccupazioni circa potenziali conseguenze economiche di un'incursione della PSA nel settore suinicolo dell'UE.

I paesi indenni dalla malattia consapevoli del rischio di introduzione della PSA sul proprio territorio dovrebbero attuare misure di riduzione del rischio come controlli commerciali e altre misure sanitarie (Sánchez-Vizcaíno, et al., 2012).

Distribuzione ASFV

Dalla prima descrizione della malattia avvenuta nel 1921, diversi paesi sub-sahariani sono stati colpiti dalla PSA e la malattia è stata limitata a questa regione fino al 1957 anno in cui si è verificato, in Portogallo, il primo focolaio al di fuori del continente africano. Questa epidemia è stata efficacemente controllata e debellata, ma in seguito un'ulteriore ondata epidemica si è verificata nel 1960 a Lisbona a causa di rifiuti dei voli aerei somministrati ai suini in allevamenti situati nei pressi dell'aeroporto (Ribeiro, et al., 1961). Recenti studi di genetica molecolare discriminano tra questi isolati, e suggeriscono la possibilità di due diverse introduzioni nell'area, da tali dati si deduce che la tracciabilità epidemica è interpretabile soltanto ricorrendo alla tipizzazione genetica. Da questi focolai iniziali, L'ASFV si diffuse in molte aree della penisola iberica (Spagna e Portogallo), dove

rimase endemica fino al 1995. Durante gli anni 70 e 80 l'ASFV si è diffusa in tutto il mondo, interessando diversi paesi europei come i Paesi Bassi (1986), Italia (1967, 1980), Francia (1964,1967, 1977) e Belgio (1985). La malattia è stata debellata da ciascuno di questi paesi, ma in Sardegna è rimasta endemica dalla sua prima introduzione nel 1982 (Figura 6). Inoltre, anche alcuni paesi delle Americhe sono stati interessati dalla malattia, in particolare a Repubblica Dominicana e il Brasile (Costard, et al., 2009).

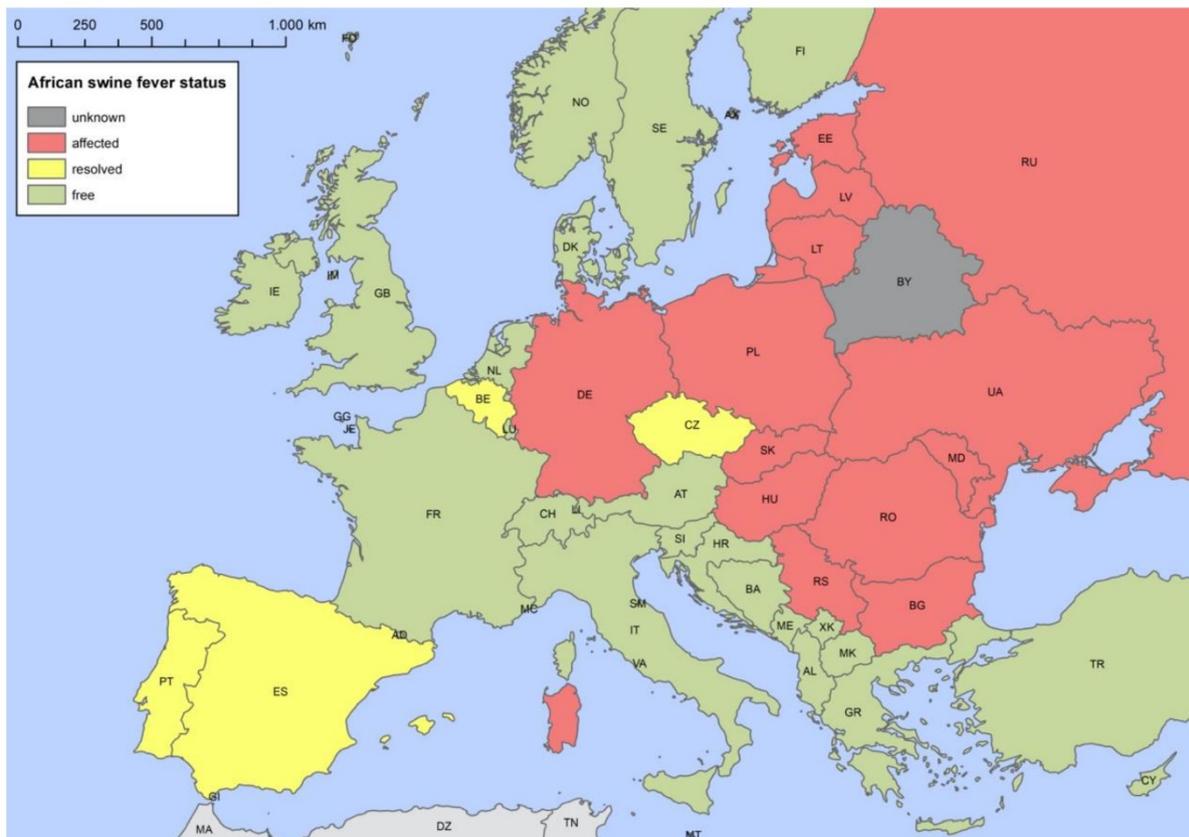


Figura 6-Situazione della peste suina africana dei diversi paesi europei al 4 agosto 2021 (Sauter-Louis, et al., 2021)

Cuba, nel 1971 è stato il primo paese della regione caraibica a segnalare l'infezione da PSA (Seifert, 1996), e si ritiene che il virus sia stato introdotto dalla Spagna. L'ASFV è stata ulteriormente segnalata alla fine degli anni 70 in diversi paesi insulari dei Caraibi: Cuba (1978 e data dell'ultimo evento 1981), Repubblica Dominicana (1978), Haiti (1979 e data dell'ultimo evento 1984). La PSA è stata segnalata in Brasile nel 1978 ed è stata probabilmente introdotta dalla Spagna o dal Portogallo attraverso rifiuti alimentari trasportati da voli transcontinentali e/o prodotti animali importati dai turisti stessi (Lyra, 2006).

Quindi, l'introduzione della malattia in questi paesi in precedenza esenti è avvenuta principalmente tramite l'alimentazione degli animali domestici con prodotti a base di carne di maiale contaminata che entrava nel territorio attraverso aeroporti internazionali e/o porti marittimi. Una volta introdotti negli allevamenti, i suini infetti e i prodotti a base di carne suina diventano le fonti principali di diffusione del virus. In ogni caso, come risultato di sforzi significativi e imponenti per il suo controllo, la malattia è stata debellata da tutti questi territori (Sanchez-Vizcaino, et al., 2013).

Nel momento in cui la peste suina africana è stata nuovamente introdotta nel continente europeo nel 2007 questa volta attraverso la Georgia, e successivamente in diversi paesi transcaucasici e nella Federazione Russa, questa malattia esotica è diventata una minaccia tangibile per l'industria suina dell'Unione Europea e la popolazione di cinghiali selvatici (Sanchez-Vizcaino, et al., 2013).

Oggi, diversi paesi europei sono stati colpiti e il virus si è diffuso in Asia, dove ha causato numerosi problemi nell'autunno del 2018. I seguenti paesi sono attualmente interessati dalla PSA nell'UE: Belgio, Bulgaria, Estonia, Grecia, Ungheria, Lettonia, Lituania, Polonia, Romania, Serbia e Slovacchia. Inoltre, Ucraina, Moldavia e Russia (ciascuno di essi segnala tutt'ora focolai). All'inizio di aprile 2020, i seguenti paesi asiatici avevano segnalato focolai di ASFV: Cina, Hong Kong, Corea del Nord, Corea del Sud, Laos, Vietnam, Myanmar, Cambogia, Indonesia, Filippine, Timor Est, Papua Nuova Guinea e India (Blome, et al., 2020).

Questo considerevole cambiamento epidemiologico potrebbe essere stato scatenato da una combinazione di diversi fattori, il più importante dei quali potrebbe essere la crescente presenza di ASFV nel continente africano negli ultimi anni; infatti, l'incidenza della PSA è aumentata nei paesi endemici ed è entrata in territori precedentemente indenni dalla malattia. Tutto questo suggerisce che la quantità di virus circolante nel mondo è aumentata, insieme al numero di animali infetti e alla quantità di prodotti suini contaminati.

Un secondo fattore importante è la globalizzazione. Al giorno d'oggi persone, animali e prodotti percorrono lunghe distanze in tutto il mondo in periodi di tempo molto brevi.

Questo “movimento continuo” (di persone ed animali) aumenta il potenziale rischio sanitario riportabile alla possibilità di introdurre agenti patogeni in nuovi territori. Il terzo fattore è l'importante crisi finanziaria globale che ha costretto i piccoli agricoltori a soddisfare le loro esigenze in modi nuovi, ad esempio utilizzando scarti di lavorazioni per nutrire i propri animali.

Questi tre fattori, insieme all'elevata resistenza dell'ASFV nell'ambiente e nei prodotti a base di carne suina, ma anche alla presenza di animali portatori asintomatici e alla mancanza di un vaccino possono spiegare come la malattia non solo sia aumentata nelle aree endemiche ma si sia anche diffusa in nuovi territori (EFSA, 2010).

Introduzione della PSA nella regione del Caucaso e nella Federazione russa

Nell'Aprile del 2007, un nuovo focolaio di PSA p72 genotipo II, compatibile con l'isolato virale circolante in Mozambico, Madagascar e Zambia, ha raggiunto il continente europeo attraverso la Georgia. Da allora, tutti gli isolati di ASFV ritrovati nella regione del Caucaso e nella Federazione Russa mostrano sequenze identiche p72, p54 il gene CVR, suggerendo che solo un isolato virale è arrivato nell'area nel 2007 e successivamente si è diffuso da questo focolaio iniziale (Gallardo, et al., 2009).

Si presume che il virus sia stato introdotto da navi internazionali contenenti rifiuti infetti che sono stati utilizzati per nutrire i suini di allevamenti situati in prossimità del porto di Poti (Beltran-Alcrudo, et al., 2008).

Dopo questa introduzione, la malattia si è diffusa molto rapidamente, colpendo quattro diversi paesi: Georgia, Armenia, Azerbaigian e Federazione Russa. In seguito, l'OIE (*Office International des Epizooties* ora definita *World Organization for Animal Health*) è stata informata di oltre 273 focolai nella regione del Caucaso, nel corso dei quali sono morti più di 76.000 animali. Questa situazione, chiaramente, ha portato a numerose perdite economiche (EFSA, 2010).

La probabilità che la PSA diventi endemica e si diffonda nelle vicine aree non colpite della Federazione Russa è stata stimata come molto elevata a causa della presenza di alcuni fattori “avversi” nell'area: infezione da ASFV dimostrata nelle popolazioni di cinghiali, un volume

estremamente elevato di commercio illegale di suini e prodotti a base di carne suina all'interno del paese, la tradizione di alimentare gli animali con scarti alimentari ma, e soprattutto, l'assenza di servizi veterinari adeguati e la mancanza di infrastrutture di produzione suina non associate a dinamiche di corretta tracciabilità (Beltrán-Alcrudo, et al., 2009).

Tuttavia, in alcune delle aree colpite della Federazione Russa, come la regione di Krasnodar, vengono applicate importanti misure di controllo. Queste misure si basano sulla diagnosi precoce e sulla notifica della malattia, promossa dalla formazione e, soprattutto dal risarcimento agli agricoltori (Shevkopyas, 2011). Dalla prima introduzione della malattia nel territorio, la PSA si è presentata in forma iperacuta-acuta, senza forme croniche della malattia e un periodo medio di incubazione di 4 giorni. Nessun cambiamento nel modello eziopatologico ed epidemiologico della malattia è stato osservato dai veterinari russi (Blagodarsnosti, 2011).

Tutti i fattori citati in precedenza e la mancanza di un programma di controllo nazionale coordinato rendono molto difficile il controllo e l'eradicazione della malattia da questa area e aumentano il rischio di diffusione nei paesi vicini, in particolare quelli che intrattengono relazioni commerciali e socioculturali con la Federazione Russa (Vlasov, 2011).

L'Unione Europea nel 2011, consapevole del potenziale rischio di introduzione della ASFV all'interno dei suoi confini, fece una valutazione del rischio (*Risk Assessment*), evidenziando una criticità nella possibile introduzione attraverso prodotti contaminati, come ad esempio scarti alimentari, utilizzati per alimentare i suini; dato che storicamente attesta come questa sia sempre stata la via più frequente di introduzione della malattia virale nei paesi indenni come Spagna, Paesi Bassi, Belgio, Cuba.

Allo stesso tempo la valutazione del rischio prevedeva che la malattia non persistesse in Europa ma si diffondesse ulteriormente, data la biosicurezza relativamente elevata dell'industria di produzione della carne suina di allora (Sanchez-Vizcaino, et al., 2013).

Sebbene le importazioni in Europa di suini e prodotti da loro derivati provenienti da zone colpite dalla PSA siano state completamente vietate sin dalla prima notifica della malattia, l'UE consapevole del rischio persistente approvò un provvedimento (2011/78 UE) che disciplina i veicoli per il trasporto di bestiame provenienti dalla Russia che devono riportare una certificazione che attesti che siano stati adeguatamente disinfettati dopo l'ultimo carico di suini (World Organization for Animal Health, 2009).

Epidemiologia della PSA in Europa

All'interno dell'Unione Europea sono stati messi in atto severi controlli sulle importazioni di animali, prodotti di origine animale e sottoprodotti di origine animale per mitigare il rischio di introduzione di malattie animali altamente contagiose. Tuttavia, le importazioni illegali o incontrollate di prodotti a base di carne suina, sia per così dire "accidentali" o involontarie da parte di turisti da paesi endemici o, cosa più importante, intenzionalmente dal contrabbando di prodotti a base di carne suina per uso personale o commerciale, rappresentano una minaccia continua (Wooldridge, et al., 2006).

Per ridurre il rischio di infezione per i suini domestici attraverso l'esposizione mediante somministrazione di rifiuti alimentari, i paesi dell'UE devono adeguarsi al regolamento relativo ai sottoprodotti di origine animale elaborato in seguito all'epidemia di afta epizootica in Europa nel 2011. L'assenza di tali regolamenti potrebbe aver portato all'introduzione della PSA nella regione del Caucaso (European Union, 2002).

Nelle regioni con la produzione di suini importati principalmente a fini commerciali, la diffusione è stata prevenuta con successo in passato attraverso un rigoroso controllo dei movimenti degli animali e l'attuazione di specifiche e concrete politiche di abbattimento. Al contrario, i sistemi di produzione suina estensiva con scarsa biosicurezza facilitano in primo luogo l'insediamento della malattia, come è accaduto in Portogallo e in Spagna.

Penisola Iberica

Nel nord-est della Spagna, dove l'allevamento intensivo di suini è predominante, la malattia si è diffusa rapidamente con conseguenze devastanti per l'intero settore produttivo. Tuttavia, in questa parte del paese le misure di controllo hanno dimostrato di avere più successo e con l'introduzione di un programma nazionale di eradicazione globale nel 1985, il 96% del paese è stato considerato indenne da PSA. Oltre alle ampie attività di monitoraggio, il programma di eradicazione si è concentrato sul miglioramento della biosicurezza negli allevamenti, su severi controlli sui movimenti degli animali e su una maggior consapevolezza delle malattie da parte degli allevatori di suini (Anon, 1990).

Fino al 1981, solo circa il 6% dei focolai di PSA nei suini domestici era associato al contatto diretto con cinghiali selvatici infetti. Si è concluso che la malattia non sarebbe persistita nei cinghiali, una

volta eliminata dai suini domestici. Ciò è stato confermato dopo l'eliminazione della PSA dalla Spagna e dal Portogallo. Nel dettaglio, un'indagine condotta nel periodo compreso tra il 2006 ed il 2010, ha suggerito come nessun cinghiale nelle aree colpite fosse positivo, indicando così che l'infezione non si fosse mantenuta nella popolazione di cinghiali selvatici nel lungo periodo (Mur, et al., 2012).

L'importanza di bacini naturali per il mantenimento della malattia è stata chiaramente dimostrata in passato e questo genera grande preoccupazione per la crescente industria suinicola in diversi paesi dell'Europa orientale. La situazione è stata ulteriormente complicata e le opzioni di controllo sono state rese più difficili dalla diffusione della malattia nelle popolazioni locali di cinghiali selvatici. Un'ulteriore diffusione verso ovest o verso est potrebbe influire negativamente sul settore suinicolo in molti paesi. Ad esempio, l'industria suina Ucraina è un importante settore agricolo in crescita con massicci investimenti stranieri nell'allevamento su larga scala. Gli allevamenti allo stato brado sembrano essere limitati; tuttavia, la presenza di cinghiali selvatici potrebbe portare alla diffusione della PSA in Moldavia, Romania, Ungheria, Slovacchia, Polonia o Bielorussia (OIE WAHID, 2009).

Stati baltici, Polonia e Germania

La situazione negli Stati baltici (Lituania, Lettonia, Estonia), Polonia e Germania differisce, sostanzialmente, dalla situazione nella Federazione russa; negli Stati baltici la maggior parte dei casi di PSA, infatti, è stata rilevata nella popolazione di cinghiali. La prima introduzione del genotipo II dell'ASFV è avvenuta nel gennaio 2014, quando la Lituania ha segnalato un caso di PSA nei cinghiali vicino al confine con la Bielorussia. Poche settimane dopo, il primo caso di PSA è stato registrato in Polonia in cinghiali, anche in questo caso vicino al confine bielorusso (Olsevskis, et al., 2016).

In seguito, l'Estonia ha segnalato casi di cinghiali selvatici infetti nel settembre 2014, nel sud-est, vicino al confine lettone, e nel nord-est, vicino al confine con la Federazione Russa.

Di fatto, nel 2019 circa l'86% della superficie della Lituania era affetta da PSA (Pautienius, et al., 2018).

In Lettonia la prima zona colpita dalla PSA si trovava al confine sud-orientale con la Bielorussia, seguita da un'introduzione nei cinghiali selvatici nel nord della Lettonia, vicino al confine con l'Estonia, presumibilmente attraverso lo smaltimento illegale di frattaglie nella foresta. Nel frattempo, quasi l'intero territorio della Lettonia è interessato dalla PSA (Olsevskis, et al., 2020).

In Polonia, fino al 2016, i casi di PSA nei cinghiali selvatici erano limitati ad un'area di circa 10 km lungo il confine con la Bielorussia. È infatti, probabile che si siano verificate ripetute introduzioni dalla Bielorussia in Polonia. Dal 2014 al 2016, i casi hanno mostrato una distribuzione nord-sud lungo il confine, con un'espansione dell'area colpita nel corso dell'anno 2017. Nel 2017 e nel 2018 il numero di cinghiali selvatici infetti da PSA è aumentato notevolmente (Pejsak, et al., 2018).

Nel settembre 2020, oltre questo confine "epidemiologicamente importante", in Germania si è registrato il primo caso di PSA nei cinghiali selvatici. Sia la vicinanza dei casi al confine tedesco-polacco che il loro raggruppamento suggeriscono diverse incursioni indipendenti in Germania. Inoltre, unitamente ai dati relativi alle sequenze del genoma virale completo ottenuto per diversi ceppi di ASFV, questo quadro dimostra come esista un'epidemia transfrontaliera che va a colpire la Polonia occidentale e la Germania (Sauter-Louis, et al., 2021).

Negli Stati baltici e in Polonia, la malattia si è diffusa principalmente attraverso la migrazione dei cinghiali, ma anche attraverso l'attività umana. Infatti, le trasmissioni su grandi distanze sono state causate ovviamente dalle attività antropiche, probabilmente smaltimenti impropri di rifiuti alimentari contaminati. In questo caso la sorveglianza per la PSA nei cinghiali selvatici è stata fatta mediante

sorveglianza attiva e passiva. Diversi studi hanno dimostrato come la sorveglianza passiva delle carcasse di cinghiale fosse superiore alla sorveglianza attiva che consisteva, fondamentalmente, nel rilevare la PSA nei cinghiali selvatici.

Diversi fattori associati all'individuazione della malattia nei cinghiali selvatici sono stati studiati in questi paesi. La densità dei cinghiali è stata considerata cruciale per la diffusione della malattia; infatti, la maggior parte dei casi si è verificata in aree con una popolazione di cinghiali selvatici superiore a 1 animale/ km quadrato. Per tanto si è concluso che ridurre la densità dei cinghiali al di sotto di tale valore poteva ridurre la diffusione della malattia (Smietanka, et al., 2016).

Altro fattore rilevante è la stagionalità, infatti negli Stati baltici e in Polonia i picchi di rilevazione della PSA sono stati nel periodo estivo, oltre che nel tardo inverno (febbraio, marzo). Finora non è stato completamente chiarito se gli effetti stagionali osservati siano imputabili ad una maggiore abbondanza di cinghiali in estate, all'aumento dell'attività venatoria in inverno o ad altri fattori al momento sconosciuti (Pautienius, et al., 2018).

In contrasto con le osservazioni fatte nella Penisola Iberica, il numero di casi registrati nei cinghiali selvatici negli Stati baltici e in Polonia ha superato di gran lunga i focolai registrati nei suini domestici (Laddomada, et al., 1994).

Repubblica Ceca e Belgio

La situazione della PSA nella Repubblica Ceca e in Belgio ha mostrato alcune somiglianze, ma altrettante differenze, con quella degli Stati baltici e della Polonia. In contrasto con le molteplici incursioni nella popolazione di cinghiali selvatici vicino al confine dei paesi vicini, la Repubblica Ceca e il Belgio hanno sperimentato introduzioni puntuali di ASFV nelle popolazioni di cinghiali selvatici in regioni a più di 300 km di distanza dalle aree colpite dalla PSA.

Va sottolineato che in entrambi i paesi sono stati colpiti solo i cinghiali. Il primo caso di PSA nella Repubblica Ceca è stato notificato nel giugno del 2017 in due carcasse di cinghiale trovate vicino all'ospedale locale di Zlin. Presumibilmente, il virus è stato introdotto attraverso l'attività umana (scarti alimentari) (OIE, 2019).

La genotipizzazione ha permesso di stabilire la somiglianza alle varianti che sono state trovate in altri paesi orientali e sub-orientali dell'UE (Moldova 2016, Ucraina 2012 e 2015, Bielorussia 2013). L'ASFV è rimasto limitato al distretto di Zlin, e in questa zona il 71,7% delle carcasse di cinghiali selvatici campionate è risultato positivo all'ASFV da giugno 2017 ad aprile 2018. Inoltre, ad aprile del 2018 è stata trovata l'ultima carcassa di cinghiale positiva ad ASFV; in totale sono stati rilevati 230 casi di PSA, dei quali 212 in cinghiali trovati morti e 18 in animali cacciati (Satran, 2020).

Ciò sottolinea nuovamente l'importante ruolo della sorveglianza passiva nella diagnosi precoce della PSA. Un anno dopo l'individuazione dell'ultimo cinghiale positivo alla peste suina africana, la Repubblica Ceca ha presentato all'Organizzazione mondiale per la salute animale (ex OIE ed attuale *World Organisation for Animal Health* WOA) un'autodichiarazione relativa all'eradicazione della PSA sul territorio.

Nonostante un'elevata densità di cinghiali nella Repubblica Ceca, l'ASFV si è diffuso ad una velocità di circa 0,5 Km/mese, cioè più lentamente rispetto a quanto accaduto negli Stati baltici e in Polonia (Vaclavek, 2020).

Analogamente alla Repubblica Ceca, l'introduzione della PSA nei cinghiali selvatici in Belgio nel 2018 è stata presumibilmente causata dall'attività umana. I primi casi di PSA nei cinghiali selvatici sono stati rilevati nel settembre 2018.

Il virus è stato identificato come genotipo II ed è risultato essere strettamente correlato ai ceppi di ASFV provenienti da Ucraina, Bielorussia, Estonia e Russia europea (Forth, et al., 2019). Fino a marzo 2020, l'Agenzia federale belga per la sicurezza della catena alimentare aveva segnalato un

totale di 833 casi di PSA nei cinghiali selvatici. In seguito, non sono più state rinvenute altre carcasse di cinghiali positivi all'ASFV. Di conseguenza il Belgio ha riacquisito il suo status di "libero da ASFV" da parte dell'OIE nel dicembre 2020 (AFSCA, 2020).

In Belgio è stata calcolata una velocità di diffusione pari a 0,39 km/settimana; la malattia si è diffusa più velocemente nelle foreste che all'esterno (Dellicour, et al., 2020).

Asia orientale, sudorientale, Australia e Nuova Zelanda

I paesi dell'Asia orientale e australe non sono mai stati colpiti dalla PSA per il momento. A causa della dipendenza dall'economie nazionali delle industrie di esportazione legate alla produzione zootecnica, Nuova Zelanda, Australia, Giappone e Corea del Sud possiedono normative sanitarie molto stringenti per le importazioni di carne suina e animali vivi, e così pure per lo smaltimento degli scarti di origine animale.

Le emergenze sanitarie della storia recente come, ad esempio, encefalopatia spongiforme bovina (BSE), peste suina classica e influenza aviaria hanno convinto i governi giapponese e coreano della necessità di rafforzare ulteriormente la capacità dei loro servizi veterinari di affrontare tali epidemie (Ozawa, et al., 2006).

Come in altre parti del mondo, l'alimentazione dei suini con prodotti animali importanti illegalmente costituisce una via d'accesso estremamente importante per l'introduzione di malattie quali afta epizootica e PSA. Ciò è stato riscontrato in una valutazione esterna dei piani di sorveglianza in Nuova Zelanda (Pearson, 2002).

L'introduzione della PSA nel Sud-Est asiatico potrebbe comportare enormi perdite, considerando l'importanza della produzione suina e del consumo della loro carne in questa parte del mondo. La Cina detiene quasi il 50% della popolazione mondiale di suini (Hartog, 2004) e la sua produzione di carne suina è destinata ad aumentare.

Anche altri paesi del Sud-Est asiatico mantengono popolazioni suine significative, principalmente per il consumo domestico e la commercializzazione locale. Il rischio di introduzione della PSA in questa regione è aumentato di recente, attraverso l'intensificazione dei legami commerciali e di sostegno per lo sviluppo della Cina con i paesi africani (Beuret, et al., 2008), poiché alcuni di questi paesi sono endemici per la PSA o hanno recentemente dichiarato la presenza di importanti focolai (ad esempio Nigeria, Zambia e Tanzania). Inoltre, l'aumento della domanda di carne suina in occasione

di eventi e festival culturali asiatici sarà probabilmente accompagnato da un aumento del rischio di introduzione e diffusione di malattie infettive come la PSA.

Anche l'importazione illegale di prodotti animali attraverso l'aeroporto internazionale di Taipei è stata considerata la via più probabile di introduzione dell'infezione durante il periodo tra Natale e il Capodanno lunare cinese (Shih, et al., 2005).

In Cina, l'alta densità di suini e la grande percentuale di piccoli allevatori di suini creano condizioni adeguate alla diffusione di malattie infettive. È stato segnalato un gran numero di spostamenti di animali vivi e prodotti correlati a livello regionale specificatamente lungo i confini meridionali cinesi (Rweyemamu, et al., 2008); questi potrebbero portare alla diffusione della PSA all'interno della regione. I vasti sistemi di allevamento dei suini all'aperto in gran parte dell'Asia complicherebbero, di fatto, l'attuazione di opportune ed efficaci misure di controllo.

Inoltre, in queste regioni, esistono potenziali serbatoi di PSA nei suini selvatici. Il Sud-Est asiatico è considerato l'origine del genere *Sus*, con sette delle otto specie presenti e sei considerate endemiche (Mona, et al., 2007).

Questa regione, in particolare la parte insulare, presenta la più alta diversità di specie di suini selvatici al mondo (Lucchini, et al., 2005) e questo chiaramente risulta essere un fattore di rischio importante per la diffusione di ASFV.

Se suscettibili all'ASFV, queste popolazioni selvatiche di suini potrebbero diventare un serbatoio di infezione e, per le specie rare, addirittura accelerarne l'estinzione. Anche *S. scofa*, come molte sottospecie negli ecosistemi del Sud e Sud-Est asiatico, potrebbe diventare un serbatoio (Nowak, 1991).

In Australia, grandi popolazioni di suini selvatici (*S. scofa*) che derivano principalmente da suini domestici introdotti potrebbero potenzialmente essere coinvolte nella diffusione e nel mantenimento della PSA. La conoscenza delle zecche asiatiche, inoltre, comprese le zecche molli di *Ornithodoros spp.* è limitata e sono quindi, necessari studi ulteriori e più approfonditi sulla loro distribuzione, ecologia e potenziale trasmissione della malattia (Ahmed, et al., 2007) per poter avere un quadro più completo della situazione epidemiologica.

Diffusione della PSA in America

Negli Stati Uniti e in Canada, la produzione di carne suina è aumentata nell'ultimo decennio (Hartog, 2004). Gli Stati Uniti rappresentano uno dei principali paesi ad importare ed esportare carne suina al mondo (FAS USDA, 2006). La principale minaccia per i suini in questi paesi è l'introduzione di prodotti a base di carne suina infettati da ASFV tramite alimenti di scarto provenienti da aerei e navi, che arrivano da paesi endemici.

Analogamente all'Europa, le rigide regole che regolano lo smaltimento di rifiuti hanno lo scopo di ridurre il rischio di introduzione della PSA. Inoltre, una sorveglianza efficiente, la tracciabilità lungo le catene di approvvigionamento e di prodotti, oltre che rigorose politiche di controllo e prevenzione dovrebbero consentire l'individuazione precoce dei focolai di PSA e l'abbattimento di tutti gli animali provenienti da allevamenti infetti, unitamente a un possibile risarcimento per le parti interessate (USDA, 2009). In alcuni paesi del Sud America, in particolare in Brasile, la produzione di prodotti di origine animale si sta sviluppando rapidamente, ed è supportata da un sistema industriale di allevamento ben organizzato. Nel 2005, Messico, Brasile e Cile rappresentavano i principali paesi esportatori mondiali di carne suina mentre il Messico rientrava anche tra i primi paesi importatori di carne suina mondiale (FAS USDA, 2006).

In America centrale e meridionale si sono registrati focolai di PSA nel 1970 e 1980. Nei Caraibi, la PSA ha portato a programmi di spopolamento dei suini che, in alcuni casi, hanno comportato l'abbattimento dell'unico bestiame di proprietà di famiglie rurali a basso reddito. Inoltre, i paesi meno sviluppati in quest'area sono ancora esposti alle conseguenze di un'introduzione dell'ASFV a causa di un rilevamento tardivo giustificato da sistemi di sorveglianza poco efficienti e imputabile ad un controllo probabilmente inefficace in assenza di fondi adeguati. A tutto ciò, aggiungiamo il verificarsi di eventi climatici estremi, instabilità politica o conflitti in paesi come Haiti che indeboliscono ulteriormente l'infrastruttura sanitaria e la capacità dei veterinari di agire in maniera tempestiva, facilitando l'introduzione e la diffusione di virus esotici come l'ASFV (Chatterjee, 2008).

I Taiassidi selvatici (*Tayassus spp.*) indigeni delle Americhe non sono sensibili all'ASFV (Fowler, 1996). Tuttavia, è opportuno sottolineare come i maiali selvatici siano diffusi in Nord e Sud America e così pure nelle isole dei Caraibi. Questo fatto, insieme alla presenza di zecche molli o *Argasidi* nei Caraibi, ha destato molta preoccupazione negli Stati Uniti. Tuttavia, la PSA è stata controllata e

debellata da Hispaniola (una delle maggiori isole delle Antille) e da Cuba nonostante il coinvolgimento di suini selvatici (Simeon-Negrin, et al., 2002).

Situazione epidemiologica in Italia

L'ASF è entrata in Sardegna molto probabilmente attraverso cibo contaminato, analogamente a quanto accaduto in Portogallo. Dalla sua prima comparsa nel 1978, la PSA è rimasta endemica in Sardegna, con focolai che si verificano nei suini domestici e nei cinghiali (Torresi, et al., 2020).

Nonostante i diversi programmi di eradicazione, sono stati rilevati focolai nei suini domestici fino al 2018, mentre l'ultimo campione positivo alla PCR (*Polymerase Chain Reaction*) nei cinghiali risale all'inizio del 2019 (Loi, et al., 2019). Tutti gli isolati sardi raccolti nel periodo compreso tra il 1978 e il 2018 appartengono al genotipo I, mentre, in altre aree d'Europa, Asia e Oceania, tutti gli isolati di ASFV circolanti appartengono al genotipo II, e tutti i genotipi p72 circolano in Africa (Dixon, et al., 2019).

Nel sud della Sardegna, la PSA potrebbe essere eliminata, mentre i tentativi di eliminazione sono falliti ripetutamente nel corso degli anni nelle regioni settentrionali, centrali e orientali dell'isola (L Mur, et al., 2016).

L'allevamento di suini *free-range* è da diversi decenni una parte fondamentale della cultura agropastorale sarda, nonostante il fatto che questo tipo di allevamento sia illegale in Sardegna, è stato ampiamente praticato fino a pochi anni fa, momento in cui sono state intraprese diverse azioni di abbattimento per ridurre queste popolazioni (Laddomada, et al., 2019). In Sardegna, l'allevamento suino è sempre stata un'attività secondaria rispetto all'allevamento di bestiame ovino; pertanto, gli allevamenti di suini domestici sono principalmente destinati all'autoconsumo e solo il 5% corrisponde ad aziende commerciali (Mur, et al., 2014).

Per allevamento di suini *free-range* intendiamo animali tenuti permanentemente all'aperto, non recintati, con accesso illimitato a campi, pascoli, foreste o boschi; senza edifici o rifugi (limitazioni strutturali, perimetrali), senza una proprietà ufficiale e chiaramente definita, né registrazione nel BDN (Database Nazionale Italiano, Banca Dati Nazionale dell'Anagrafe Zootecnica) (Rolesu, et al., 2021).

Sono stati forniti incentivi agli agricoltori per garantire il rispetto delle norme di biosicurezza e per spingerli ad abbandonare pratiche illegali, inoltre sono state condotte anche campagne di

sensibilizzazione sulla malattia. Studi recenti hanno dimostrato l'efficacia delle misure adottate in Sardegna negli ultimi anni per contenere ed eradicare la PSA; infatti, a partire dal 2014 il numero di allevamenti all'aperto è diminuito drasticamente (Loi, et al., 2019).

I serbatoi naturali del virus sono i suidi selvatici naturalmente resilienti (facoceri) o le zecche del genere *Ornithodoros*; questi, tuttavia, sono assenti in Sardegna (Sánchez, et al., 2016). Non è mai stato dimostrato un ruolo centrale svolto dal cinghiale nel mantenimento della malattia in Sardegna, mentre diversi studi hanno ripetutamente suggerito un ruolo chiave per i suini allo stato brado nella persistenza dell'ASFV sull'isola, probabilmente agendo come serbatoio del virus (Laddomada, et al., 2019).

Sono stati identificati quindi, diversi fattori di rischio per la persistenza della PSA in Sardegna, come ad esempio il numero di allevamenti di medie dimensioni, la presenza di suini allevati allo stato brado (in particolare la razza locale chiamata "brado") e infine la densità stimata di cinghiali.

Anche dopo quattro decenni di presenza e circolazione di ASFV sull'isola, la prevalenza nei cinghiali selvatici in Sardegna è risultata estremamente bassa (10% di sieroprevalenza nel periodo 2011-2016) (Cappai, et al., 2018).

Tale dato risulta essere molto più basso rispetto alla recente prevalenza nei suini allo stato brado, per i quali gli anticorpi verso ASFV sono stati riscontrati in oltre il 50% degli animali esaminati (Iglesias, et al., 2017). I cinghiali positivi ad ASFV sono stati trovati solo in aree endemiche, dove si sono verificati focolai nei suini domestici. Pertanto, analogamente alla situazione evidenziata nella Penisola iberica, la PSA non è stata apparentemente in grado di stabilire un ciclo di infezione indipendente nella popolazione di cinghiali.

Per stimare la distanza di trasmissione di ASFV più adeguata al contesto rurale sardo sono stati presi in considerazione due elementi specifici (Rolesu, et al., 2021):

- Le indagini epidemiologiche hanno riportato valori medi di distanza tra casi primari e secondari di 3 km e un valore massimo di 10 km, mentre la trasmissione a lunga distanza (>10 km) è limitata;
- Le vie di trasmissione a lunga distanza sono associate molto probabilmente a rifiuti alimentari infetti, mentre la maggior parte dei movimenti illegali di animali (principalmente identificati come movimenti di maschi per la riproduzione) si è verificata in prossimità dell'azienda.

Si è ipotizzato che la malattia potrebbe scomparire spontaneamente dalla popolazione di cinghiali, dopo l'eliminazione dai suini domestici (Laddomada, et al., 1994). Infatti, i contatti tra cinghiali

selvatici e suini domestici allevati allo stato brado infetti e le ripetute reintroduzioni nella popolazione di cinghiali selvatici sono stati definiti come necessari per il mantenimento della malattia sull'isola. Uno studio recente ha evidenziato interazioni dirette e indirette tra suini domestici bradi e cinghiali selvatici in un'area endemica di PSA della Sardegna, indicando che questi contatti hanno facilitato la trasmissione della PSA sull'isola. Ciò è stato confermato ulteriormente anche in uno studio retrospettivo, che ha dimostrato come le interazioni spaziali tra cinghiali e suini bradi si siano verificate in prossimità degli allevamenti (Bosch, et al., 2020).

Nel quadro dell'ultimo piano regionale di eradicazione della PSA (PE-ASF 15-18: Decreto Regionale n.5/6. 6 febbraio 2015, e successive integrazioni), sono state adottate diverse azioni per l'eliminazione dei suini allo stato brado illegali, coordinate da un'apposita unità emanata dal governo sardo ("Unità di progetto"). Durante i primi sei mesi di queste azioni di abbattimento (dicembre 2017-giugno 2018) è stata rilevata un'elevata prevalenza della malattia e i veterinari dell'*Animal Health Service* (AHS) o della task force specializzata GIV (Gruppo di Intervento Veterinario) hanno osservato come questi animali fossero apparentemente sani e in buono stato nutrizionale al momento dell'abbattimento e, probabilmente, questa maggior tolleranza ha una base genetica. Questi suini si erano probabilmente ripresi completamente dall'infezione e potrebbero aver agito come portatori di ASFV contribuendo alla trasmissione del virus e alla contaminazione ambientale anche dopo 42 giorni dall'evento infettivo (Franzoni, et al., 2020). La più alta prevalenza anticorpale è stata rilevata nel comune con la più alta densità di suini liberi, Orgosolo, mentre la più alta prevalenza del virus è stata rilevata a Desulo.

Questi animali "sopravvissuti" probabilmente hanno sviluppato una risposta immunitaria protettiva nei confronti della malattia, e questa protezione potrebbe essere stata trasmessa alla prole attraverso colostro /latte. La protezione nei confronti di ASFV si basa su molteplici meccanismi immunitari concomitanti, che sono purtroppo, in gran parte sconosciuti, ma gli anticorpi potrebbero aver contribuito in qualche modo a questa protezione e all'evidente ritardo della diffusione di ASFV nell'ospite (Escribano, et al., 2013). Sono, tuttavia, necessari ulteriori studi per comprendere meglio il ruolo degli anticorpi materni o di altri elementi presenti nel colostro nella protezione contro l'ASFV dei suini allo stato brado in Sardegna.

Anche se la Sardegna non è stata ancora dichiarata indenne dalla PSA, il contesto insulare sembra essere adeguato, e tale riconoscimento non dovrebbe farsi attendere ancora a lungo.

Nuova incursione di PSA nell'Italia continentale

L'Italia continentale è stato l'ultimo paese europeo a segnalare la diffusione della PSA, dove il primo cinghiale affetto da ASFV genotipo II è stato trovato nella regione Piemonte (Ovada, in provincia di Alessandria) nel gennaio 2022 a causa dell'attività di sorveglianza passiva locale. Successivamente diversi altri casi positivi sono stati segnalati nella popolazione di cinghiali in tutta la Liguria e il Piemonte, un'area montuosa tra il mare e le Prealpi, nonché il territorio urbano di Genova (Iscaro, et al., 2022).

Il 5 maggio 2022 la PSA è stata rilevata anche nella regione Lazio, in un giovane cinghiale presente nella zona nord della città di Roma e qualche settimana dopo, il 26 maggio, un ulteriore caso isolato è stato identificato nella provincia di Rieti in una carcassa di cinghiale incidentata. Successivamente il 9 giugno, la malattia è stata riscontrata anche in un allevamento suinicolo semibrado, a Roma, a poca distanza dalla zona di rinvenimento della prima carcassa di cinghiale infetta dell'area (Ministero della Salute, 2023).

Come previsto dalla normativa Europea (Regolamento UE 2016/429, Regolamento UE 2020/687), è stata istituita immediatamente una zona infetta tramite accordo ministeriale. Attualmente, comprende un'area corrispondente a 2811 km² che copre 114 comuni delle regioni Liguria e Piemonte (Figura 7), e in Lazio riguarda i comuni della provincia di Rieti e la zona di Roma; inoltre è stata identificata una zona limitrofa con un raggio di 10 km (Italian Ministry of Health, 2022).

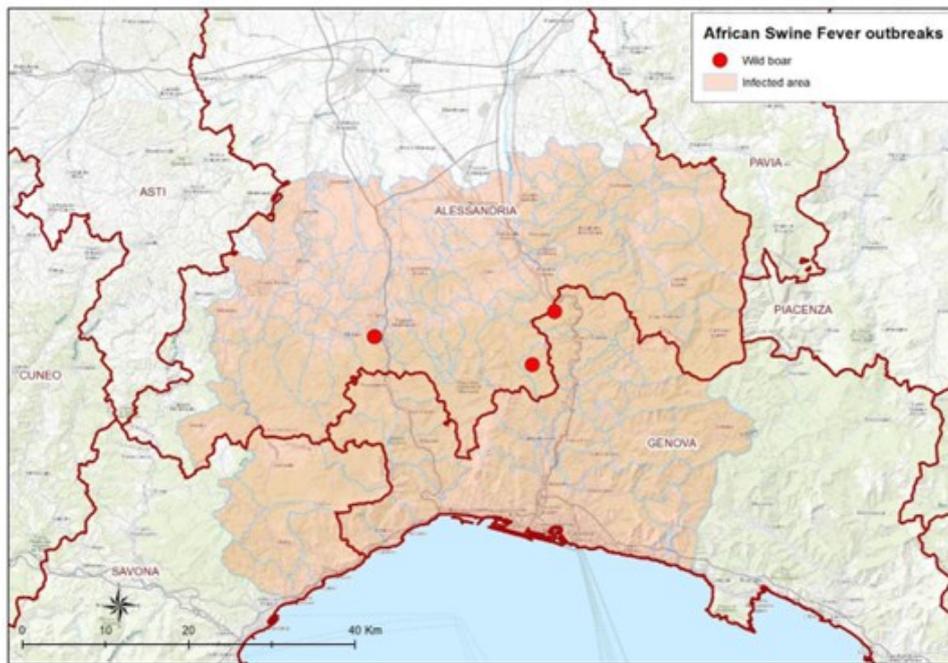


Figura 7-Zona infetta da PSA Italia continentale, accordo ministeriale, 11 gennaio 2022 (Iscaro, et al., 2022)

Nell'Italia continentale è in corso quindi la diffusione iniziale del virus in una popolazione di cinghiali suscettibili, con un elevato numero di casi non identificati. La sottostima dei casi potrebbe essere dovuta a diversi motivi, come le grandi dimensioni della zona infetta e le sue caratteristiche geografiche, ma anche quelle aree inaccessibili per le quali la visibilità delle carcasse può essere bassa a causa della presenza di fitte foreste, crepacci, burroni e neve (Iscaro, et al., 2022).

A circa un anno dal rilevamento del virus sul territorio continentale, la malattia rimane confinata alle regioni Piemonte, Liguria e Lazio; il fronte di malattia in Piemonte e Liguria è in lenta ma progressiva espansione sui versanti est ed ovest delle zone di infezione primaria e ciò determina la continua rimodulazione delle zone di restrizione (Ministero della Salute, 2023).

Mentre la situazione epidemiologica del Lazio sembra essere più favorevole, con l'assenza di nuovi casi sia nei selvatici sia nei domestici a partire da settembre del 2022. Questo trend positivo ha consentito di ridurre le zone di restrizione sia nella provincia di Rieti come pure in quella di Roma (Ministero della Salute, 2023).

I risultati degli studi iniziali di caratterizzazione molecolare hanno evidenziato un'elevata omologia di sequenza (99,80%- 99,90%) con altri ceppi rappresentativi di genotipo II caratterizzati nella regione del Caucaso, nella Federazione Russa, nel Sud-Est asiatico e nell'Europa centro-orientale.

Quindi tali dati indicano che l'introduzione dell'ASFV nell'Italia continentale è stata causata, molto probabilmente, da attività antropiche; sono invece scarse le possibilità di introduzione di ASFV genotipo I dalla Sardegna data l'assenza di casi a partire dal 2019 (Laddomada, et al., 2019).

Le condizioni riportate in Italia continentale rappresentano un nuovo scenario per il controllo della diffusione dell'ASFV nella popolazione di cinghiali, a causa del territorio montuoso interessato, e l'applicazione di nuove modalità operative può essere necessaria per il contesto italiano (Iscaro, et al., 2022).

Diffusione della Peste Suina in Africana Repubblica Popolare Cinese e paesi limitrofi

Il primo focolaio di PSA in Asia è stato segnalato nell'agosto 2018 e si è verificato nella Cina nord-orientale (Shenyang City, provincia di Liaoning). Poiché l'Asia, in particolare la Cina, rappresenta circa il 50% della popolazione suina globale, questa malattia ha già avuto un impatto sostanziale sull'agricoltura in tutto il mondo, senza alcuna prospettiva imminente di eradicazione e controllo della stessa (Pitts, et al., 2019).

La diffusione della PSA in tutta l'Asia è stata in gran parte unidirezionale. La similarità delle epidemie in diversi paesi, nonostante date di inizio molto diverse, suggerisce che le epidemie hanno avuto origine da un'unica fonte che poi si è propagata in tutta l'Asia (Figura 8). La caratterizzazione molecolare del virus sia in Cina che in Vietnam ha rivelato ceppi altamente omologhi, anch'essi in gran parte identici a quelli caratterizzati da epidemie avvenute in Georgia nel 2007, Russia nel 2012 e Polonia nel 2015 (Ge, et al., 2018). Pertanto, è altamente probabile che lo stesso ceppo coinvolto nel riemergere della PSA in Europa sia stato responsabile dei nuovi focolai in tutta l'Asia.

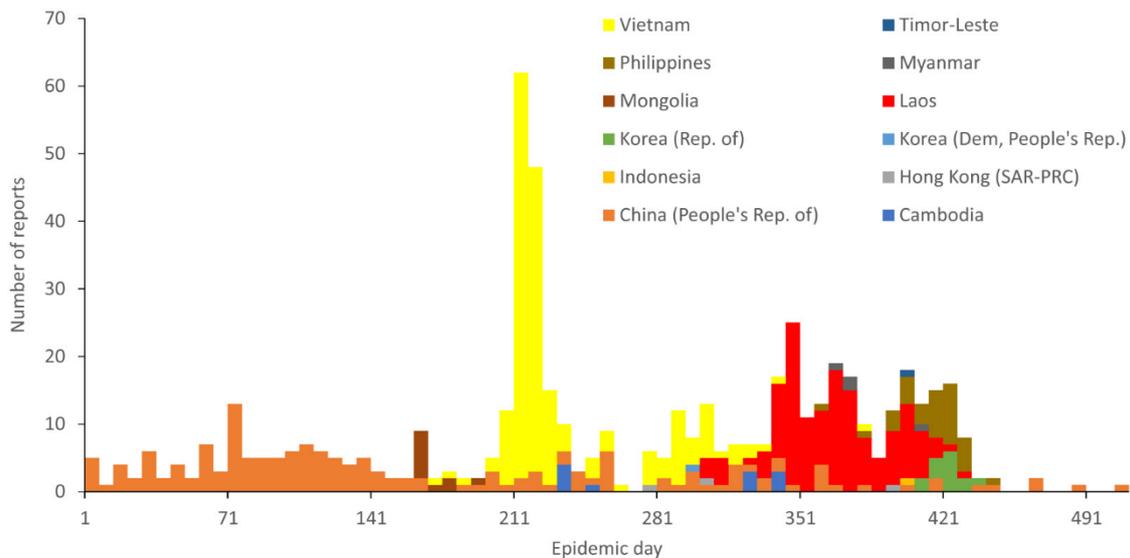


Figura 8- Distribuzione, per settimana e paese/regione, del numero di segnalazioni confermate di focolai di peste suina africana diagnosticati in Asia 2018-2019. Giorno 1 = 1° agosto 2018, Giorno 507 = 20 dicembre 2019. I dati sono stati estratti dall'Organizzazione mondiale per la salute animale (Mighell, et al., 2021).

Nel 2018 l'ASFV di genotipo II simile a quello riscontrato in Georgia nel 2007 è emerso in Cina e si è diffuso in altri 15 paesi asiatici, ed oggi in queste aree geografiche sono prevalenti (Zhao, et al., 2019). Uno studio di sorveglianza, in seguito, ha rilevato che degli ASFV di tipo II a bassa virulenza sono emersi in Cina nel 2020 a causa di mutazioni naturali nei genomi degli isolati virali altamente virulenti; questi mutanti hanno mostrato una minore virulenza ma un'elevata trasmissibilità (elevata morbilità), causando infezioni croniche e persistenti nei suini colpiti. Questi isolati sono stati escreti per via orale e rettale con basse cariche virali, il che causa maggiori difficoltà gestionali e sfide impegnative per la diagnosi precoce e il controllo della PSA in Cina (Sun, et al., 2021).

Ad oggi, sono emersi anche isolati di genotipo I simili a NH/P68 e OURT88/3 (primi due isolati portoghesi di tipo I) con una virulenza inferiore rispetto agli isolati virali di genotipo II attenuati. Questi ASFV a bassa virulenza mostrano periodi di incubazione più lunghi, trasmissibilità efficiente e causano una lieve insorgenza di infezioni e malattie croniche. I suini infetti sono escretori in maniera continua di virus e sviluppano viremia di basso livello, il che rende la diagnosi precoce difficile rispetto ai virus di genotipo II attenuati (Sun, et al., 2021).

Sono state ipotizzate diverse cause dell'introduzione iniziale di ASFV in Asia, tra cui l'alimentazione dei suini con rifiuti alimentari contaminati, esposizione ad altri prodotti a base di carne suina infetta,

fomiti provenienti da regioni infette, trasmissione tramite zecche ai suini e infine trasmissione tramite cinghiali selvatici (Yu, et al., 2015).

Inoltre, è ragionevole pensare che parte della diffusione del virus sia dovuto all'alta densità di suini, in Cina (~45 suini/ km²) che è quasi la metà di quello del Vietnam (~80 suini /km²) e alla presenza di allevamenti in tutta l'Asia su piccola scala caratterizzati da scarsi livelli di biosicurezza. Storicamente il trasporto su lunghe distanze dei suini è sempre stato praticato il che potrebbe essere, di per se, un importante fattore di rischio per la diffusione di ASFV (Lu, et al., 2020).

Mentre la maggior parte dei focolai di PSA segnalati sembrava verificarsi in modo progressivo e sequenziali senza salti estremi a lunga distanza, si sono registrati alcuni casi che non si adattano a questo modello. Alcuni focolai sono stati segnalati all'interno di un'ampia area geografica che spazia tra le Filippine e l'Indonesia; sebbene queste nazioni sia insulari, sono ancora geograficamente vicine ai focolai dell'Asia continentale e quindi la diffusione potrebbe essere avvenuta con i metodi sopra descritti.

Tuttavia, i focolai a Timor Est si sono verificati a più di 2.000 km di distanza dal focolaio più vicino. Sebbene non sia chiaro come ciò sia avvenuto, è preoccupante perché suggerisce come l'ASFV possa essersi spostato su lunghe distanze e possibilmente si sia diffuso ulteriormente al di fuori dell'Asia in aree indenni da ASFV, come l'Australia e le nazioni insulari del Pacifico (Mighell, et al., 2021).

Pertanto, l'emergere degli ASFV di genotipo I causerà più problemi e porrà sfide maggiori per l'eradicazione della PSA in Cina. I nuovi isolati di genotipo I emergenti possono causare gravi danni e continue perdite economiche all'industria suina, una volta che si diffondono negli allevamenti o infettano scrofe e verri da riproduzione. La sorveglianza nazionale degli isolati di ASFV di genotipo I è quindi necessaria ed urgente per ridurre al minimo le perdite causate dalla loro infezione in Cina (Sun, et al., 2021).

CAPITOLO 5- Misure di controllo e prevenzione per la PSA: approccio One Health

Il mondo in cui viviamo si sta trasformando ad un ritmo senza precedenti, a causa del cambiamento climatico, della crescente domanda di risorse e della perdita di biodiversità che saranno probabilmente le sfide più importanti che la società dovrà affrontare nei decenni futuri (Díaz, et al., 2019).

La crescita esponenziale della popolazione umana, e l'escalation delle attività antropiche sono diventati i principali responsabili di queste sfide globali, costringendo la società stessa ad un cambiamento permanente. Le modifiche di utilizzo del suolo, la globalizzazione del commercio e dei movimenti, sommato all'evoluzione del comportamento dei consumatori e all'incremento globale della domanda di proteina di origine animale stanno comportando profondi cambiamenti nel sistema alimentare globale, ma soprattutto nei sistemi di allevamento (Charlier, et al., 2022).

I sistemi alimentari presenti al giorno d'oggi sono fortemente divergenti tra i differenti paesi, ma fondamentalmente li possiamo raggruppare in due categorie:

- Sistemi che producono alimenti essenziali per diete sane in quantità e qualità non sufficienti ad un prezzo accessibile;
- Sistemi che producono grandi quantità di cibo a discapito del degrado dell'ambiente naturale, perdita di biodiversità e del cambiamento climatico (Willett, et al., 2019).

Questa considerazione rende evidente come la salute degli animali sarà fondamentale per sostenere la transizione verso sistemi alimentari più efficienti sotto il profilo delle risorse ma anche salubri e sostenibili dal punto di vista ambientale e caratterizzati da elevati standard di benessere animale. La salute del bestiame è un prerequisito per la salute globale, lo sviluppo economico, la sicurezza alimentare e la qualità nutrizionale dell'alimento. La strategia da perseguire non può che essere indirizzata alla mitigazione dei cambiamenti climatici e al contenimento della perdita di biodiversità secondo un approccio *One Health* (Destoumieux-Garzón, et al., 2018).

Risulta evidente che ridurre l'onere delle malattie che affliggono gli animali, comprese le zoonosi, e gestire adeguatamente le malattie emergenti, la resistenza antimicrobica e antiparassitaria sono considerate priorità per raggiungere sistemi di allevamento sostenibili. Per diverse malattie che colpiscono gli animali non si dispone di strumenti di controllo specifici, e le soluzioni disponibili per tutelare e garantire la salute degli animali richiedono un'innovazione continua per affrontare questioni come il cambiamento delle pratiche zootecniche, le aspettative dei consumatori, i possibili residui

negli alimenti o nell'ambiente e soprattutto gli agenti patogeni resistenti ai farmaci (Mottet, et al., 2018).

Le malattie infettive degli animali possono essere suddivise in tre categorie; epizootiche, zoonotiche ed enzootiche, ciascuna delle quali porta a diverse vie decisionali e ad altrettante misure di controllo.

Le malattie epizootiche (corrispondenti alle epidemie in medicina umana) sono talvolta indicate come malattie transfrontaliere; inducono in genere effetti improvvisi, spesso fatali, e influenzano il commercio. Il controllo delle epizootie è per lo più soggetto a misure di controllo nazionali ed internazionali (ad esempio, sistemi di sorveglianza obbligatori, test e politiche di abbattimento come, ad esempio, per la Rift Valley e per la peste suina africana) (Charlier, et al., 2022).

Risulta evidente che i vaccini veterinari costituiscono una componente essenziale per proteggere la salute animale e umana e sono fondamentali per affrontare malattie nuove ed emergenti (Meeusen, et al., 2007). Sono spesso considerati un metodo di controllo sostenibile perché possono fornire una protezione duratura, non lasciano residui farmaceutici nell'ambiente e possono ridurre la necessità di utilizzare antimicrobici. Tuttavia, le lacune tecniche ed operative ricollegabili allo sviluppo di nuovi vaccini nell'ambito veterinario, rappresentano una forte preoccupazione per quanto riguarda la praticità d'uso, la durata dell'immunità indotta, la riserva strategica per affrontare le epidemie (Hoelzer, et al., 2018).

La struttura dell'ASFV come spunto per la realizzazione di vaccini

Negli ultimi due decenni sono stati scoperti molti virus giganti a DNA, alcuni dei quali hanno dimensioni maggiori sia come genoma che dimensioni fisiche rispetto a piccoli batteri, sfidando la definizione tradizionale di virus come agenti infettivi piccoli e filtrabili. Sebbene la maggior parte di essi abbia un impatto economico estremamente limitato sulla società, una delle poche eccezioni è proprio rappresentata dal virus della peste suina africana (ASFV) (Xian, et al., 2020).

A causa delle loro dimensioni e della complessità strutturale, gli studi dei virus giganti hanno proposto numerose sfide anche se, un recente studio, ha individuato la caratteristica più interessante di ASFV, che è rappresentata dalla sua struttura multistrato unica (Figura 9).

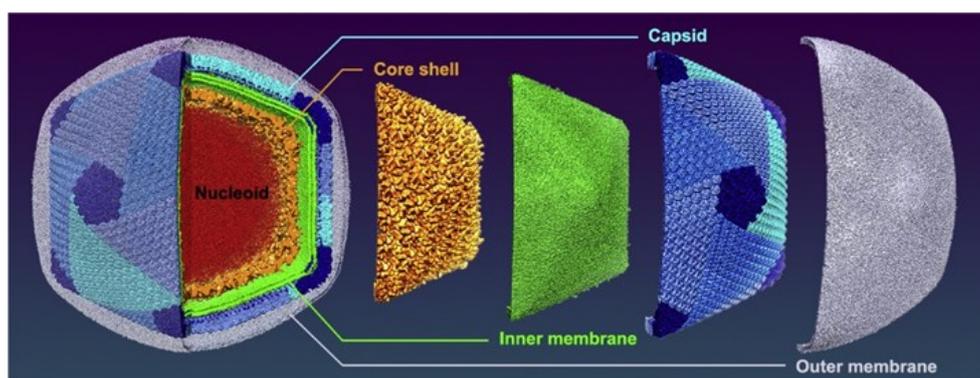


Figura 9- L'architettura multistrato del virus della peste suina africana (ASFV). I cinque strati, tra cui il nucleo del genoma, il nucleocapside, la membrana interna, il capsid e la membrana esterna, sono colorati rispettivamente in rosso, arancione, verde, blu e grigio. Per una migliore osservazione sul capsid, la membrana esterna è stata raffigurata con una trasparenza del 70% (Xian, et al., 2020).

Mentre la maggior parte dei virus a DNA icosaedrico gigante possiedono gusci proteici (capsidi) come strati più esposti verso l'esterno, ASFV presenta una membrana esterna probabilmente acquisita dalla membrana cellulare ospite durante il processo di gemmazione (Xiao, et al., 2017). Sotto alla membrana c'è il tipico capsid proteico icosaedrico, poi troviamo una membrana lipidica interna che è comunemente presente in altri virus a DNA icosaedrico giganti. Tuttavia, ASFV ha un guscio centrale icosaedrico appena al di sotto della membrana interna a differenza dei soliti nucleocapsidi sferici o sacchi genomici di altri virus giganti (Xiao, et al., 2017).

Le scoperte derivanti da questi studi non solo approfondiranno la nostra comprensione del ciclo di vita dell'ASFV, ma apriranno anche la strada allo sviluppo di molecole vaccinali e nuovi farmaci finalizzati a combattere la malattia che sta, letteralmente, devastando l'industria mondiale della carne suina (Liu, et al., 2019).

Comprensione dei meccanismi immunitari indotti da ASFV e del loro possibile coinvolgimento nella realizzazione di un vaccino

Nonostante il basso potenziale zoonotico di ASFV e la gamma di ospiti specifici, questo virus sta avendo un impatto socio-economico significativo, minacciando l'industria globale della carne suina. Secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), da gennaio 2020 a gennaio 2022 i focolai di PSA sono stati segnalati in 35 paesi in tutto il mondo, tra cui 4767 casi (1.043.334 animali deceduti) nei suini domestici e 18.262 casi (29.970 animali deceduti) nei cinghiali selvatici (Wang, et al., 2022).

Sebbene ASFV abbia causato gravi danni all'industria suinicola, attualmente sono disponibili solo misure di controllo ed eradicazione basate principalmente sulla diagnosi precoce e su rigorose politiche di eliminazione (*stamping out*), e purtroppo attualmente non è ancora disponibile nessun vaccino autorizzato. Il fattore critico che ostacola lo sviluppo di vaccini sicuri ed efficaci è la mancanza di prove riguardanti alcuni aspetti della patogenesi e una profonda comprensione dei meccanismi di evasione immunitaria innata di ASFV (Cackett, et al., 2020).

L'immunità protettiva nei confronti di ASFV è poco conosciuta, tuttavia così come per la maggior parte delle infezioni virali, l'immunità innata e le risposte umorali e cellulari sembrano essere determinanti per la protezione nei confronti di questo virus (Urbanoa, et al., 2022).

Nonostante i primi studi indicassero una mancanza di attività neutralizzante degli anticorpi nei confronti di ASFV, recenti ricerche sembrano ribaltare questa convinzione ormai radicata da lungo tempo nella comunità scientifica (Escribano, et al., 2023). Questa neutralizzazione mediata da anticorpi presenta tuttavia alcune caratteristiche non comuni, tra cui spicca la perdita di suscettibilità alla neutralizzazione per passaggio in coltura cellulare a causa di cambiamenti nella composizione fosfolipidica delle membrane virali e/o della presenza di anticorpi bloccanti sierici che inibiscono la completa neutralizzazione (Escribano, et al., 2023).

L'emoagglutinina ASFV CD2v/EP402R è forse la proteina virale più significativamente implicata nell'immunità protettiva (Ruiz-Gonzalvo, et al., 1996). CD2v, insieme all'antigene virale ausiliario HA, C-type Lectin/EP153R, è anche tra i geni ortologhi a più elevata variabilità tra gli isolati ASFV, fornendo antigeni potenzialmente significativi nell'immunità sierogruppo-specifica.

L'immunità protettiva specifica evidenziata tramite inibizione dell'emoagglutinazione (HAI) di ASFV è un concetto recente, supportato da dati che indicano come la genotipizzazione del gene che codifica per la proteina p72 non sia completamente correlata, in merito alla protezione incrociata omologa o eterologa, poiché ceppi distinti sono talvolta in grado di indurre protezione crociata, mentre ceppi che sembrano strettamente correlati non riescono a fornire cross-protezione (Urbanoa, et al., 2022).

Diversi studi, hanno individuato potenziali epitopi neutralizzanti virali che includono le proteine del capsido virale p30/CP204L, p54/E183L e p72/B646L, le proteine virali B602L, C44L, CP312R, E183Lp, K145R e K205R, così come le proteine strutturali A104R, p10/K78R e le proteine non strutturali ribonucleotide reduttasi (F334L, F778Rp), DNA ligasi (NP419L) e timidina chinasi (TK/K169R) (Arias, et al., 2017).

Oltre alla neutralizzazione del virus mediata da anticorpi, altri ruoli potenzialmente protettivi sono stati evidenziati e sono riportabili a meccanismi quali la citotossicità cellulo-mediata anticorpo-dipendente (ADCC) e la citotossicità mediata dal complemento (CDC) (Zsak, et al., 1993).

È probabile quindi, che anche l'immunità cellulare sia essenziale per la protezione nei confronti di ASFV. Ruoli chiave, infatti, sono stati indicati per le cellule *T natural killer* (NK) e CD8 (Leitão, et al., 2001).

Sono in corso ulteriori studi per l'identificazione di altri determinanti delle cellule T CD8 in ceppi sia attenuati che virulenti allo scopo di chiarirne il loro potenziale protettivo (Goatley LC, 2020).

In conclusione, le prove disponibili indicano che l'induzione della protezione coinvolge sia meccanismi anticorpo-mediati che cellulari, ma gli antigeni e le tipologie di risposte cellulari richieste, richiedono un'ulteriore caratterizzazione (Urbanoa, et al., 2022).

Approcci vaccinali per la PSA

Vaccini inattivati

L'inattivazione del virus è un approccio consolidato per la produzione di vaccini, relativamente semplice da raggiungere e con un profilo di sicurezza più elevato rispetto ai vaccini vivi. Il processo di inattivazione impedisce la regressione ad un fenotipo virulento e i virus vaccinali non sono trasmissibili, evento che invece rappresenta il principale svantaggio dei vaccini attenuati.

L'inattivazione, tuttavia, non si traduce necessariamente in un vaccino che suscita immunità protettiva. Infatti, i tentativi di immunizzazione dei suini con una varietà di antigeni inattivati derivati da ASFV, utilizzando metodi tradizionali, sebbene in alcuni casi in grado di indurre una risposta immunitaria sierologica, alla fine non hanno portato a una protezione sufficiente (Blome, et al., 2014).

Ciò non è forse del tutto sorprendente, dal momento che l'immunità cellulare sembra essenziale per la protezione e che un'efficace neutralizzazione del virus è difficile da raggiungere nelle infezioni primarie (Arias, et al., 2017). I ricercatori dell'*International Livestock Research Institute* in Kenya (ILRI) in collaborazione con la Colorado State University (CSU) stanno ora tentando di sviluppare un vaccino inattivato utilizzando un nuovo metodo (Vogt, 2021), originariamente sviluppato per il trattamento degli emoderivati.

In caso di successo, i benefici includeranno un profilo di sicurezza tossicologica ben consolidato, con poca o nessuna tossicità o rischio di smaltimento per il personale della struttura o l'ambiente, e la produzione rapida e conveniente di candidati vaccini utilizzando attrezzature, reagenti e prodotti monouso disponibili in commercio, ciò lo renderebbe disponibile in luoghi ad alto e basso reddito in tutto il mondo, il più vicino possibile alle aree endemiche. Una varietà di preparazioni di vaccini ASFV, utilizzando adiuvanti specifici, è attualmente in fase di valutazione per le risposte immunitarie (Urbanoa, et al., 2022).

Vaccini a subunità, DNA e a virus vettore

I vaccini a subunità utilizzano proteine ricombinanti purificate o peptidi sintetici che codificano epitopi virali specifici in grado di indurre una risposta immunitaria protettiva. Ciò si ottiene utilizzando tecnologie convenzionali di DNA biochimico o ricombinante per generare un antigene formulato con un adiuvante (Urbanoa, et al., 2022).

In alternativa, la tecnologia può essere utilizzata per generare un plasmide o un costrutto ricombinante vivo a virus vettore contenente il DNA che codifica l'antigene o gli antigeni di interesse per l'espressione in vivo. Questi vaccini a DNA e a vettori virali presentano un vantaggio rispetto alle formulazioni inattivate basate sull'antigene in quanto sono in grado di indurre risposte immunitarie di tipo cellulo-mediato. Inoltre, i vettori virali hanno l'ulteriore vantaggio di essere in grado di penetrare attivamente nelle cellule dell'ospite e replicarsi come vaccino vivo attenuato (LAV) e sono adatti per differenziare gli animali infetti da quelli vaccinati (DIVA) con immunogeni codificati da vettori che fungono da marcatori vaccinali (Urbanoa, et al., 2022).

Come descritto precedentemente, diversi antigeni ASFV sono stati valutati per il loro potenziale protettivo, comprese le proteine strutturali p54, p30, p72 e l'emoagglutinina CD2v; queste proteine sono state tradizionalmente i principali bersagli delle strategie di vaccino a subunità e a DNA. Gli esperimenti preliminari di vaccinazione basati sull'antigene utilizzando p54 e p30 ricombinanti espressi nel *Baculovirus* hanno conferito un grado variabile di protezione che va da un ritardo nell'insorgenza della malattia alla protezione completa (Gómez-Puertas, et al., 1998).

Anche un p54/p30 chimerico espresso nello stesso sistema ha riscosso un certo successo, infatti i suini hanno sviluppato anticorpi neutralizzanti e sono sopravvissuti alla sfida con il virus virulento (Barderas, et al., 2001). In un altro studio, tuttavia, una combinazione di p54, p30 e p72 espressi da *Baculovirus* non è riuscita a indurre protezione (Neilan, et al., 2004). CD2v espresso da *Baculovirus* ha anche dimostrato un certo grado di protezione nei confronti della forma virale virulenta, sebbene la protezione sia stata indotta in assenza di anticorpi neutralizzanti.

Studi ancora più recenti effettuati con cocktail di antigeni fino a 47 diversi geni ASFV veicolati da *Adenovirus*, *Alfavirus* e vettori del virus vaccinia si sono dimostrati capaci di indurre forti risposte cellulari antigene-specifiche (Lokhandwala, et al., 2019).

Un'ulteriore sperimentazione ha verificato l'efficacia di un pool composto da otto geni di ASFV tra cui B646L (p72), CP204L (p30), CP530R (pp62) e MGF 110-4L e 110-5 veicolati da *Adenovirus* umano 5 con deficit di replicazione e vaccinia Ankara. Lo studio ha portato ad una riduzione dei segni clinici e così pure dei livelli ridotti di viremia in una percentuale di suini dopo la "sfida" con l'isolato virulento OUR T88/1 (Netherton, et al., 2019).

Nel lungo periodo, i vaccini a subunità, DNA e vettori virali mostrano risultati promettenti e diversi candidati hanno confermato di riuscire ad indurre specifiche risposte immunitarie umorali e / o cellulari che sembrano conferire una protezione parziale o completa. Tuttavia, la diversa natura dei protocolli di immunizzazione utilizzati in questi studi, incluso il tipo di vaccino, la strategia di vaccinazione e il modello di sfida (*experimental trials*), rende difficile confrontare i risultati. Saranno necessari ulteriori lavori per identificare quali meccanismi immunitari debbano essere attivati per conferire una protezione completa e duratura, quali antigeni (o combinazione di questi) dovrebbero essere inclusi in un potenziale vaccino e il metodo di somministrazione più appropriato (Urbanoa, et al., 2022).

Vaccini vivi attenuati (LAV)

I LAV aggirano un problema chiave presentato sia dai preparati inattivati che da quelli a subunità o a DNA. Poiché possono replicarsi con successo all'interno dell'ospite, imitano l'infezione naturale innescando così percorsi sia umorali che cellulari e non richiedono adiuvanti con attività co-stimolatoria per migliorare l'entità e la qualità della risposta immunitaria.

Inoltre, alcuni LAV hanno dimostrato di suscitare anticorpi mucosali IgA, una caratteristica importante per i vaccini somministrati per via orale (l'immunizzazione orale è un requisito per i vaccini destinati alla popolazione di cinghiali) (Urbanoa, et al., 2022). Detto questo, i LAV presentano un leggero rischio, poiché in rari casi i ceppi attenuati possono riacquistare patogenicità, causando la diffusione della malattia e possono, potenzialmente, causare reazioni post-vaccinazione ed effetti collaterali.

Tre strategie principali sono state impiegate nella generazione di LAV ASF: attenuazione per passaggio cellulare, screening per ceppi naturalmente attenuati e delezione di geni associati alla virulenza. Per superare alcuni dei problemi di biosicurezza presentati dai LAV, vale a dire la virulenza residua, sono stati fatti anche tentativi di ulteriore delezione di geni associati alla virulenza in ceppi naturalmente attenuati o il ricorso a tecniche di adattamento a linee cellulari eterologhe di virus con eliminazione genica. A seconda dell'immunogenicità dei geni eliminati, questi candidati possono anche essere adatti per DIVA (Urbanoa, et al., 2022).

L'attenuazione per passaggio cellulare ha il suo fondamento nelle osservazioni di Manso e Sánchez; è stato dimostrato come il passaggio continuo dei ceppi virulenti di ASFV circolanti di genotipo I nel midollo osseo suino e nelle cellule renali abbia provocato attenuazione (Balysheva, et al., 2015). I trials sperimentali hanno dimostrato che i maiali immunizzati con il ceppo attenuato risultavano protetti nei confronti del ceppo virulento, tuttavia, le successive prove sul campo si sono dimostrate disastrose, con animali che sviluppano PSA cronica.

Recenti tentativi di utilizzare questa strategia su ceppi di genotipo II attualmente circolanti in Europa includono l'attenuazione del ceppo Stavropol 01/08 per passaggio nella linea cellulare ibrida di linfociti suini A4C2/9k e nella linea cellulare di rene di scimmia verde africana CV-1 (Balysheva, et al., 2015). Sebbene i virus risultanti abbiano perso la patogenicità, non sono riusciti a proteggere i maiali dalla "sfida" sperimentale con ceppi virulenti.

Complementare all'attenuazione per passaggio cellulare è lo screening di ceppi naturalmente attenuati non emoadsorbenti (non-HAD) e/o ceppi con ridotta virulenza che si verificano naturalmente durante le epidemie di PSA. Gli esempi includono i ceppi ASFV non HAD di genotipo I NH/P68 (Leitão, et al., 2001) e OURT88/3 isolati nella penisola iberica rispettivamente da suini e zecche cronicamente infetti e che potrebbero essere derivati dal virus del vaccino a passaggio cellulare Manso (Portugal, et al., 2015).

I suini immunizzati con questi ceppi sono risultati protetti nella sfida con ceppi virulenti (Gallardo, et al., 2019), e in alcuni casi è stata dimostrata una protezione crociata parziale verso virus eterologhi (Malogolovkin, et al., 2015), con livelli di protezione compresi tra il 66 e il 100%. Sebbene questi ceppi naturalmente attenuati abbiano il potenziale per essere sviluppati come LAV, esiste preoccupazione per la loro virulenza residua, poiché una percentuale sostanziale dei suini vaccinati, almeno a determinate dosi, sviluppa reazioni post-vaccinazione assolutamente inaccettabili.

Una terza strategia, fondamentale per l'attuale ricerca LAV ASF, è la delezione razionale di geni associati alla virulenza o geni coinvolti nell'evasione della risposta immunitaria mediante ricombinazione omologa o editing genico. Questo approccio è stato sviluppato per migliorare il profilo di sicurezza dei ceppi naturalmente attenuati e per l'attenuazione dei ceppi virulenti circolanti. Finora sono stati presi di mira diversi geni tra cui: l'emoagglutinina CD2v/EP402R, la timidina chinasi TK/K169R, l'inibitore NF- κ B e NFAT A238L (Urbanoa, et al., 2022).

Tuttavia, la “cancellazione razionale” non sempre produce il risultato desiderato. Diversi studi, infatti, confermano che i risultati delle modificazioni genetiche dell'ASFV possono essere imprevedibili e che l'effetto delle delezioni geniche sulla capacità del virus di suscitare protezione immunitaria è molte volte specifico del ceppo. Inoltre, la delezione concomitante dei fattori di virulenza può, occasionalmente, produrre virus deboli che non possono essere coltivati in vivo o mancano della capacità di indurre risposte protettive ed efficaci (Urbanoa, et al., 2022).

Forse il candidato LAV più promettente fino ad oggi, tuttavia, è il ceppo ASFV-G- Δ I177L proposto dal gruppo di ricerca del Professor Borca (Borca, et al., 2020) Può essere somministrato per via intramuscolare e oronasale (Borca, et al., 2021), inducendo una robusta immunità nei confronti della “sfida” con l'isolato parentale virulento ASFV Georgia, coinvolto in recenti epidemie; inoltre si è dimostrato efficace nelle prove sul campo di follow-up contro il ceppo virulento vietnamita.

La notevole biodiversità propria dei ceppi si rivela essere una concreta ed oggettiva difficoltà nello sviluppo di un vaccino nei confronti della PSA. Come già discusso, la protezione incrociata è un

fenomeno multifattoriale che dipende da numerose variabili. La maggior parte dei vaccini sperimentali verso la PSA si rivolge ai genotipi che circolano in Europa e in Asia con poca attenzione ai 24 genotipi endemici in Africa, ed è tuttavia improbabile che proteggano nei confronti di questi ceppi più filogeneticamente distanti.

La variabilità genetica tra le diverse razze di suini è un altro fattore in gioco, riflesso dai diversi modelli di patogenesi e dagli esiti clinici osservati in diverse regioni del mondo. L'alto livello di mutazioni genetiche che guidano la diversità dei ceppi nell'ASFV, insieme alla caratterizzazione di varianti ricombinanti di ASFV tra isolati italiani e sudafricani e all'identificazione delle regioni variabili MGF (*Multigene Family Proteins*) e di altri punti di ricombinazione, si aggiungono a un crescente numero di prove dell'elevata plasticità del genoma dell'ASFV (Urbanova, et al., 2022),

Oltre ad essere in grado di proteggere in modo incrociato, le formulazioni LAV dovrebbero anche essere compatibili con le campagne di immunizzazione della fauna selvatica. I cinghiali, infatti, sono altamente sensibili alla PSA e sono stati la principale fonte di diffusione della malattia nell'attuale epizoozia in Europa. Tuttavia, data la grande popolazione di cinghiali, che si stima sia di milioni, e la sua ampia distribuzione, esiste un alto rischio di endemicità, che complicherebbe gravemente gli sforzi di controllo e di eradicazione. Un vaccino specifico per i cinghiali è quindi un investimento necessario. Sfortunatamente, la maggior parte dei LAV sperimentali sono stati somministrati per via intramuscolare e sono stati condotti pochi studi sull'immunizzazione per via orale (Borca, et al., 2021).

Va notato che, anche se tutte queste sfide fossero superate, un vaccino contro la PSA sarebbe ancora solo uno strumento un possibile per il controllo della malattia. Poiché la segnalazione di focolai di PSA nelle regioni esenti da malattia comporta restrizioni commerciali ed è necessaria la conferma dell'assenza di malattia per riottenere il permesso di esportazione, un fattore critico nella decisione di operare un piano vaccinale sarebbe lo stato della malattia nel paese, e risulterebbe essenziale avere a disposizione un test diagnostico che confermi l'assenza di malattia. Pertanto, una strategia DIVA è essenziale (Borca, et al., 2020).

Suini geneticamente modificati resistenti alle infezioni virali come alternativa alla terapia vaccinale

I suini, come una delle specie più importanti del patrimonio zootecnico, svolgono un ruolo indispensabile e strategico in agricoltura. Condividono caratteristiche genetiche, fisiologiche e anatomiche e dimensioni corporee simili agli esseri umani e sono considerati importanti candidati come donatori di organo per gli xenotrapianti. Inoltre, i suini rappresentano un importante organismo modello per approfondimenti fisiopatologici e per comprendere i meccanismi delle malattie dell'uomo (Renukaradhya, et al., 2015).

Pertanto, è fondamentale mantenere la stabilità dell'industria suina a beneficio delle filiere agroalimentari ma anche del settore biomedico. A tal fine, l'industria suina, in via di sviluppo globale, deve affrontare le sfide rappresentate dai virus di origine suina, tra cui ASFV.

Negli ultimi decenni, sono stati sviluppati vaccini verso le malattie virali suine per migliorare l'immunità adattativa degli ospiti (Makadiya, et al., 2016). Tuttavia, diversi virus possono ancora sfuggire alla sorveglianza immunitaria (Müller, et al., 2011).

Di conseguenza, è di importanza fondamentale sviluppare un mezzo efficace per proteggere gli ospiti dall'infezione di questi virus o per bloccare la replicazione virale. Recentemente, la tecnologia di modifica genetica è stata applicata con successo sui suini per aumentare la tolleranza alle malattie degli animali e migliorarne i tratti economici. Pertanto, la generazione di suini geneticamente modificati con questa tecnologia può costituire un ulteriore “strumento” plausibile ed efficace per combattere i virus di origine suina (Yuan, et al., 2022).

Attualmente, non esiste un vaccino davvero efficace nei confronti della PSA, e le strategie principali ed attive nel controllare la PSA risultano essere la quarantena e la macellazione dei suini infetti.

Come il virus della sindrome riproduttiva e respiratoria suina (PRRSV), l'ASFV si replica prevalentemente nei macrofagi alveolari suini (PAM). Studi precedenti hanno dimostrato come l'ASFV si replichi principalmente in specifici siti citoplasmatici, che sono stati indicati come vere e proprie “fabbriche virali”, sebbene gran parte della sintesi del DNA di ASFV avvenga nel nucleo nelle prime fasi dell'infezione (Alcamí, et al., 1989). Nonostante decenni di sforzi da parte dei virologi, il recettore chiave della modifica genetica. Tuttavia, non vi sono ancora state segnalazioni di suini resistenti a PEDV (virus della diarrea epidemica suina), ASFV e PRV (virus della pseudorabbia) in ragione della mancanza di comprensione dei recettori chiave nell'infezione virale.

In futuro però, la tecnologia di screening della libreria CRISPR / Cas9 a livello di genoma potrebbe rivelarsi un metodo ideale per individuare i recettori chiave nell'infezione da PEDV, ASFV e PRV (Niu, et al., 2017).

Questi suini geneticamente modificati hanno mostrato una notevole resistenza ai virus, indicando una buona prospettiva per il controllo dell'infezione virale. Tuttavia, questa nuova tecnologia desta alcune preoccupazioni, per cui risulta essenziale aumentare le dimensioni della popolazione e supervisionare le caratteristiche di produzione e le caratteristiche di riproduzione dei suini geneticamente modificati. Inoltre, non è ancora stato definitivamente chiarito se la sostituzione delle proteine del recettore suino con proteine omologhe di altre specie possa rendere il virus contagioso per altre specie animali (Yuan, et al., 2022). Si tratta quindi di una nuova frontiera, che necessita ovviamente di ulteriori studi e approfondimenti ma getta le basi per possibili soluzioni all'epidemia di ASFV.

Elevati livelli di biosicurezza come misura di prevenzione nell'introduzione di ASFV

Progettare scientificamente la struttura degli allevamenti di suini e attuare rigorose misure di biosicurezza sono prerequisiti per ridurre efficacemente la via di trasmissione dell'ASFV, e di conseguenza per proteggere gli animali sensibili all'infezione (Reicks, 2019).

La biosicurezza tipica di un allevamento suino comprende alcuni aspetti fondamentali, tra cui, la progettazione rigorosa e accurata degli ingressi del personale e delle stanze di isolamento. L'ingresso del personale è diviso in tre parti, tra cui un'area "sporca", una zona di transizione e un'area "pulita"; è prevista, inoltre, la presenza di panchine in legno massiccio, chiamate barriere, posizionate tra le due diverse aree per evitare la contaminazione tra i differenti ambienti.

I dipendenti lasciano i loro vestiti, scarpe e cappelli "sporchi" nell'area sporca, si lavano le mani e fanno la doccia nella zona di transizione, quindi indossano tute e stivali puliti. Poiché, il personale è un'importante fonte di infezione di ASFV (Dixon, et al., 2019) gli allevamenti di suini devono prestare attenzione alla costruzione delle infrastrutture e debbono disporre di un rigoroso processo di ammissione e garantirne l'attuazione.

Se invece, poniamo l'attenzione sulle procedure di biosicurezza applicate durante le operazioni di commercio e trasporto di prodotti alimentari di origine suina tra vari paesi del mondo, vediamo che l'ispezione rigorosa e la quarantena dei prodotti derivati dai suini devono essere effettuate nei dipartimenti doganali negli aeroporti internazionali, nei terminal di spedizione e nelle stazioni

ferroviarie per impedire ai passeggeri internazionali di portare qualsiasi tipo di prodotto a base di carne di maiale e di conseguenza veicolare l'introduzione di agenti patogeni in paesi indenni. Inoltre, il cibo avanzato su voli internazionali, navi o treni deve essere smaltito correttamente (MacLachlan, et al., 2017).

Risulta evidente che la corretta applicazione delle procedure di biosicurezza può contribuire ad impedire l'introduzione e a ridurre la diffusione del virus della PSA nell'industria suinicola.

Valutazione dell'efficacia di alcune categorie di disinfettanti nei confronti di ASFV

In assenza di strumenti di vaccinazione, la prevenzione dell'introduzione e della diffusione secondaria dell'ASFV nell'industria suina nazionale si basa rigorosamente su misure di biosicurezza.

La biosicurezza è definita in vari modi da organismi internazionali quali l'OIE (OIE, 2019) e la FAO e presenta una definizione puntuale secondo la normativa sulla salute degli animali (Regulation (EU) 2016/429, 2022).

Tutte le definizioni disponibili descrivono la biosicurezza come un insieme di misure, procedure e atteggiamenti che hanno l'obiettivo comune di ridurre il rischio di introduzione e diffusione della malattia. Una valutazione dei fattori di rischio per l'introduzione e la diffusione secondaria dell'ASFV è quindi indispensabile per identificare misure di biosicurezza efficaci che si basano su: segregazione, pulizia e disinfezione.

I prodotti più testati contro l'ASFV sono i composti del cloro, agenti ossidanti raccomandati dal manuale dell'OIE sull'ASFV (OIE, 2019). Entrambi i gruppi di sostanze chimiche dipendono fortemente dall'assenza di materiale organico per essere altamente efficaci. Pertanto, è necessaria una pulizia accurata nel momento in cui vengono selezionati questi composti.

Pochi studi sono stati condotti su aldeidi, composti fenolici e composti a base di iodio. In particolare, i composti fenolici sembrano essere efficaci in presenza di materiale organico e sono a basso costo (Haas, et al., 1995). Inoltre, non sono disponibili dati sull'attività virucida degli alcoli contro l'ASFV. I dati disponibili sull'efficacia dei composti chimici contro l'ASFV indicano che tutti i gruppi di sostanze chimiche testate sono efficaci contro l'ASFV, differendo per la modalità d'azione e l'applicabilità sui diversi materiali. Sulla base dei dati disponibili, l'ipoclorito di sodio dimostra un'ottima efficacia nei confronti dell'ASFV, ma la sua efficacia diminuisce in presenza di materiale organico; può, inoltre, risultare irritante e corrosivo, limitandone l'applicazione in diversi specifici scenari.

Gli agenti ossidanti sono composti potenti. Durante le procedure di decontaminazione, presentano corrosività per diversi metalli e questo dovrebbe essere preso in considerazione quando si pianifica la decontaminazione degli allevamenti di suini infetti. La glutaraldeide è molto utilizzata nel settore veterinario, ma è irritante per la cute e per gli occhi. Tuttavia, sono disponibili pochi studi sulla sua efficacia verso l'ASFV e ulteriori indagini in diversi contesti sperimentali possono chiarire la sua efficacia e l'eventuale suo impiego proposto durante i focolai di ASFV (Beato, et al., 2022).

I composti fenolici possono avere una buona gamma di applicazioni. Sembrano essere efficaci contro l'ASFV e si dimostrano ancora efficaci in presenza di materiale organico. L'ASFV è un virus complesso che causa una malattia complessa con due cicli epidemiologici (quello domestico e quello silvestre) che richiedono approcci diversi dal punto di vista della gestione della malattia. Questo si riflette anche nella fase di decontaminazione dell'ASF che, quindi, può essere pianificata e sviluppata in modi diversi a seconda dello scenario di campo. Ciò implica che potrebbero essere necessari protocolli e procedure di decontaminazione definite ad hoc in base ai singoli scenari (Beato, et al., 2022).

Farmaci anti-ASFV

Negli ultimi decenni, sono stati documentati alcuni composti o farmaci disponibili in commercio con attività anti-ASFV in vitro. Nello studio proposto dal gruppo di ricerca di Colpitts (Colpitts, et al., 2013) è stato riferito che aUY11, un derivato nucleosidico aromatico, non solo presentava una significativa attività inibitoria contro virus come il virus dell'influenza A (IAV) e il virus dell'epatite C (HCV), ma poteva anche inibire la proliferazione di ASFV in modo dose-dipendente a livello cellulare (Hakobyan, et al., 2018).

Inoltre, in uno studio recente è stato scoperto che i fluorochinoloni potrebbero inibire la replicazione del virus bloccando DNA-Topo II di ASFV. Galindo e collaboratori hanno inoltre notato che i polifenoli come il resveratrolo e il resveratrolo ossidato potrebbero inibire la proliferazione dell'ASFV sopprimendo la replicazione del DNA virale e la sintesi proteica virale tardiva. Infine, è stato notato come l'amiloride, un farmaco impiegato nel trattamento clinico delle malattie edematose, sia un efficace inibitore della macrofagocitosi ed abbia una significativa attività anti-ASFV sulle cellule (Galindo, et al., 2011).

Tuttavia, la ricerca su questi composti si è bloccata solo a livello cellulare in vitro, e i loro potenziali effetti nei suini infetti da ASFV rimangono ancora da determinare.

Sopravvivenza del virus della peste suina africana in diversi salumi tradizionali italiani

Come già detto in precedenza, la PSA è un esempio di malattia animale transfrontaliera che è stata ripetutamente introdotta in aree indenni attraverso importazioni illegali di prodotti a base di carne suina da parte di turisti o per scopi commerciali, o attraverso lo smaltimento illegale di rifiuti da navi o aerei provenienti da aree colpite da PSA (Costard, et al., 2013).

Anche il commercio internazionale di carne suina potrebbe contribuire alla diffusione di specifiche infezioni suine. Questa è la causa delle restrizioni applicate dai singoli paesi come misura protezionistica. Una deroga generalmente accettata riguarda però i prodotti a base di carne riscaldati o cotti che sono considerati "sicuri" per quanto riguarda l'inattivazione degli agenti patogeni. La posizione dei prodotti a base di carne che non possono essere trattati termicamente a causa delle loro particolari caratteristiche, ma sono conservati mediante salatura ed essiccazione è piuttosto diversa. Questo è il caso delle carni di salsicce macinate come il salame e altri prodotti a base di carne stagionata come la pancetta e il lombo di maiale, che dovrebbero essere controllati per escludere potenziali rischi di sopravvivenza del virus dovuti alla contaminazione delle materie prime (Petrini, et al., 2019).

Gli studi sulla sopravvivenza di ASFV nei prodotti a base di carne suina sono alquanto impegnativi a causa della ampia varietà di matrici in cui il virus potrebbe essere contenuto, nonché delle tecniche di preparazione e conservazione degli alimenti che differiscono ampiamente da regione a regione. Pertanto, i dati forniti dalla letteratura sono spesso difficili da interpretare. In tal caso, le indagini di sopravvivenza del virus in questi prodotti dovrebbero essere eseguite su qualsiasi produzione specifica e in condizioni pratiche di utilizzo, dalla raccolta delle materie prime fino allo stoccaggio e alla trasformazione del prodotto. Chiaramente, questo non è un approccio realistico a causa della complessità operativa richiesta, nonché delle inevitabili spese elevate (Bartolo, et al., 2015).

Detto ciò, consideriamo che la sopravvivenza del virus nel prodotto dipende dalle proprietà dell'agente, in particolare dalla stabilità / labilità (al tempo, alla temperatura e al pH), e dalle proprietà intrinseche del prodotto come pH, attività dell'acqua, temperatura di lavorazione e conservazione e salinità (Farez, et al., 1997).

L'interazione di queste proprietà del prodotto e la proteolisi enzimatica che si verifica in molti prodotti sono fattori significativi nell'inattivazione degli agenti virali. La sopravvivenza di diversi virus suini

è stata studiata e riportata sia nella carne non stagionata che nella carne lavorata secca (Panina, et al., 1989).

Secondo l'Istituto nazionale di statistica, nel 2017 la domanda interna di prodotti a base di carne suina è stata pari a circa 1200 mila tonnellate, metà delle quali riconducibili a prosciutti (sia cotti che stagionati). La produzione di salame, pancetta e lombo rappresenta circa il 20% del commercio italiano. Contemporaneamente, le esportazioni verso gli Stati membri dell'UE e i paesi terzi sono aumentate negli ultimi anni, soprattutto per quanto riguarda i prosciutti, mentre il salame e la pancetta rappresentano rispettivamente il secondo e il terzo prodotto crudo più esportato (Guarino, et al., 2013).

Nello studio del Professor Petrini (Petrini, et al., 2019) è stato valutato l'effetto del processo di stagionatura a secco sull'inattivazione dell'ASFV in tre diversi prodotti italiani a base di carne stagionata (salame, pancetta e lombo) preparati a partire da suini infettati sperimentalmente. Nel complesso, i dati hanno mostrato che i risultati della lavorazione e della stagionatura delle carni suine non sono influenzati dalla presenza della malattia e che la persistenza del virus nei prodotti a base di carne non è stata influenzata dal calo del pH (5,0-5,8) che si verifica dopo la macellazione durante le prime fasi della lavorazione. Al contrario, nessuna infettività virale è stata rilevata né dalla coltura tissutale né dall'inoculazione animale oltre i 18, 60 e 83 giorni di stagionatura rispettivamente nel salame, nella pancetta e nel lombo italiani (Guarino, et al., 2013).

Rispetto ad altri prodotti derivati dal maiale come prosciutto, lombo e pancetta di maiale, il salame ha il vantaggio di essere macinato, comune a tutti i tipi di tecnologia (seppur con differenze nelle dimensioni delle particelle muscolari e grasse), insieme all'aggiunta di zucchero e alla presenza di una ricca e variegata flora batterica nella carne macinata (sia naturalmente presente che aggiunta), in grado di indurre acidificazione e proteolisi, che certamente influenzano i virus eventualmente presenti.

Pertanto, tali prodotti, se ottenuti applicando i metodi commerciali menzionati nel presente studio, è estremamente improbabile che rappresentino una fonte di trasmissione della malattia attraverso il commercio internazionale, poiché il virus non è stato "recuperato" oltre il periodo di trasformazione.

Al contrario, il virus vitale è stato rilevato nel lombo e nella pancetta di maiale poco dopo il periodo di stagionatura (oltre 23 e 39 giorni, rispettivamente) entro la durata di conservazione dei prodotti, rappresentando quindi potenziali pericoli a breve termine in caso di esposizione a popolazioni animali sensibili. Di conseguenza, l'UE beneficerebbe di ulteriori strumenti di supporto decisionale per

valutare il rischio di introduzione di malattie causate dall'importazione illegale di prodotti a base di carne suina, al fine di aggiornare la sua strategia di sorveglianza (Petrini, et al., 2019).

In conclusione, l'approfondimento di questo aspetto potrebbe migliorare la conoscenza della sopravvivenza di ASFV, fornendo dati preziosi per sviluppare criteri per l'importazione e la commercializzazione di questi salumi provenienti dai paesi infetti. Ciò potrebbe anche offrire l'opportunità di rivedere alcuni criteri stabiliti nella legislazione europea (European Union Council Directive, 2002) secondo cui è necessario un trattamento che preveda la fermentazione naturale e la maturazione per almeno 190 giorni per il prosciutto e 140 giorni per il lombo, per eliminare i rischi per la salute degli animali legati alla carne contaminata da ASFV.

CAPITOLO 6- Quadro normativo italiano per la gestione della PSA

Il Piano nazionale di Sorveglianza ed eradicazione per la Peste Suina Africana (PSA) per l'anno 2023, anche alla luce della attuale situazione epidemiologica nazionale, prevede l'esecuzione di attività di sorveglianza nelle aree del territorio nazionale libere dall'infezione, ed attività di eradicazione nelle aree in cui la malattia è presente.

Ritenendo rilevante il rischio di ulteriori incursioni del virus sia per contiguità, sia attraverso quello che viene definito il "fattore umano", sul territorio continentale indenne è indispensabile innalzare il livello della sorveglianza passiva sia nelle popolazioni di suini selvatici come pure in quelli domestici. In particolare, si rende necessario consolidare il sistema nazionale di allerta precoce per PSA, migliorare le azioni di sorveglianza passiva, avviare strategie a medio-lungo termine per la gestione della popolazione di cinghiali, rafforzare il sistema di biosicurezza negli allevamenti suinicoli e proseguire le attività di comunicazione/informazione/formazione degli *stakeholders*.

Nei territori coinvolti dalla malattia le misure finalizzate alla eradicazione della PSA prevedono di contenere l'infezione nelle zone infette, riducendo progressivamente l'area di circolazione virale, ed evitare la diffusione alla popolazione suinicola. In particolare, le attività previste sono il rafforzamento della sorveglianza passiva, la ricerca attiva delle carcasse di cinghiale, il divieto di ogni attività outdoor che rechi disturbo alla popolazione di cinghiali residente determinandone l'allontanamento e il relativo rischio di diffusione del virus, la creazione di adeguate barriere di contenimento della popolazione selvatica, la sorveglianza attiva mediante trappolaggio/abbattimenti dei selvatici, l'abbattimento preventivo dei suini domestici, il divieto di movimentazione di suini vivi e loro prodotti, una adeguata campagna di comunicazione e informazione al pubblico (Ministero della Salute, 2023).

La rete degli II.ZZ.SS. (Istituti Zooprofilattici Sperimentali) è stata autorizzata ad eseguire la diagnosi di prima istanza di Peste Suina sui campioni di suini domestici e selvatici prelevati nell'ambito del Piano Nazionale. I test da eseguire da parte degli II.ZZ.SS. competenti per territorio comprendono analisi virologiche per la ricerca del genoma dei virus della PSA e della PSC (Peste Suina Classica) attraverso metodiche biomolecolari (RT-PCR). Attualmente, ai fini degli obiettivi del Piano (nuovo approccio di *epidemic intelligence* indicato come *early detection* (World Health Organization, 2014) per la sorveglianza e misure rafforzate di sorveglianza passiva per l'eradicazione), non è prevista l'esecuzione di test sierologici, che possono essere richiesti caso per caso dal CEREP (Centro di

Referenza Nazionale per lo studio delle malattie da *Asfivirus* e *Pestivirus* presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Umbria e Marche) (Ministero della Salute, 2023).

Territorio continentale indenne

Il piano di sorveglianza passiva per PSA nei cinghiali e suini si articola nelle differenti casistiche.

Prelievo di organi/carcassa da cinghiale rinvenuto morto o moribondo

Le segnalazioni della presenza di qualsiasi cinghiale rinvenuto morto (per cause ignote o in caso di incidente stradale) oppure moribondo in zone urbane, periurbane, boschive; possono essere effettuate da qualsiasi cittadino, in particolare cacciatori, escursionisti, forze dell'ordine in servizio (Carabinieri Forestali per esempio). Sulla base delle segnalazioni, il servizio veterinario della ASL localmente competente coordina il sopralluogo e la raccolta dei campioni.

Il prelievo dei campioni deve essere eseguito adottando le adeguate condizioni di biosicurezza, commisurate al contesto epidemiologico oltre a quello ambientale. È preferibile che la carcassa (intesa come intera o ridotta a resti biologici) venga rimossa dall'ambiente e trasportata ad un centro di smaltimento in tempi rapidi e secondo procedure ben definite.

Tuttavia, almeno in fase di sorveglianza, resta prioritario procedere al prelievo dei campioni, anche laddove non si possano garantire tutte le condizioni di biosicurezza. In condizioni di campo, le situazioni ambientali (incidenti stradali, ritrovamenti in posti impervi o pericolosi) e/o lo stato delle carcasse stesse (avanzato stato di decomposizione) che, talvolta, implicano l'impossibilità di operare e campionare in condizioni ottimali. In questi casi, il concetto dell'*early detection* in fase di allerta o pre-allerta deve comunque prevalere, pertanto si raccomanda di procedere al prelievo di campioni utili in primis a verificare l'eventuale presenza del virus e successivamente organizzare le misure di bonifica ambientale, compreso lo smaltimento definitivo dei resti organici in base ai risultati dei test diagnostici. In altri termini, in caso di positività ai test diagnostici, laddove le operazioni di rimozione e bonifica non siano già state effettuate, si raccomanda di tornare tempestivamente sul luogo del prelievo e attivare le procedure di pulizia e disinfezione. In ogni caso, allo scopo di contenere al massimo il rischio biologico, è necessario individuare ed adottare le misure più idonee caso per caso.

È necessario prelevare da ogni carcassa almeno un organo da sottoporre ai test diagnostici. Gli organi target da prelevare sono in ordine prioritario di scelta i seguenti:

– Milza

- Rene
- Linfonodi
- Sangue
- Tonsille
- Osso lungo
- Carcassa intera

I campioni devono essere prelevati in quantità sufficiente a consentire l'esecuzione dei test di laboratorio, considerando la necessità di eseguire test di conferma in caso di eventuale risultato positivo. Il personale che preleva il campione e ne gestisce il trasferimento al laboratorio deve avere la massima cura affinché il campione arrivi a destinazione in condizioni idonee ad essere esaminato e non si deteriori ulteriormente. Da ogni animale sottoposto a campionamento deve essere prelevato almeno un campione. Se più soggetti vengono campionati contemporaneamente i campioni devono essere tenuti separati (Ministero della Salute, 2023).

Prelievo di organi/carcassa di cinghiale in caso di sospetto PSA

Il sospetto può essere formulato:

- su base clinica e/o anatomopatologica, ogni qualvolta si rinvenga un cinghiale, anche moribondo, o una carcassa di cinghiale che presenti sintomi clinici o lesioni post mortem riferibili alla Peste Suina;
- su base epidemiologica, qualora le informazioni disponibili indichino la presenza di PSA in territori adiacenti a zone infette oppure epidemiologicamente collegati;
- sulla base del riscontro di un aumento della normale mortalità di cinghiali (ritrovamento di carcasse nell'ambiente in misura superiore all'1% della popolazione stimata come residente) in un definito territorio;
- in qualunque altra circostanza in cui l'autorità centrale abbia comunicato un innalzamento del livello di rischio.

In fase di sospetto la carcassa deve essere gestita nel rispetto di rigorose e scrupolose misure di biosicurezza da applicare ai resti rinvenuti, ai residui organici, a tutti gli attrezzi/materiali utilizzati,

nonché ai mezzi di trasporto. Nel caso in cui i campioni prelevati risultassero positivi, particolare attenzione va posta nell'applicazione delle misure di biosicurezza sull'intera area di ritrovamento.

In caso di sospetto il servizio veterinario della ASL localmente competente si attiva immediatamente per prelevare i campioni utili alla diagnosi di conferma. È necessario prelevare da ogni carcassa almeno un organo da sottoporre a test diagnostici. Gli organi target da prelevare sono i medesimi elencati nel paragrafo precedente, in ordine di priorità di scelta.

I campioni devono essere adeguatamente identificati attraverso etichetta e associata alla scheda generata dal Sistema Informativo Veterinario per la Sicurezza Alimentare (SINVSA) (Ministero della Salute, 2023).

Prelievo di organi/carcassa per sorveglianza PSA in azienda suinicola

Per garantire un adeguato livello di campionamento nell'ambito della sorveglianza passiva della PSA nelle aziende suinicole, il servizio veterinario della ASL localmente competente organizza un flusso di campioni secondo gli obiettivi fissati nel Piano nazionale. La popolazione target di questo campionamento suppletivo include tutte le aziende di suini del territorio regionale; su base settimanale, il servizio veterinario della ASL localmente competente preleva campioni di organo da almeno 2 suini morti in azienda e li invia all' IZS competente per territorio per l'esecuzione di test biomolecolari per la ricerca del genoma del virus della PSA e della PSC (*Real Time-PCR*).

Le aziende suinicole indicate come maggiormente a rischio per l'introduzione del virus sono quelle che hanno un numero ridotto di capi (fino a 50). Queste aziende, per lo più a carattere familiare, dovrebbero essere prioritariamente coinvolte nel campionamento. Tuttavia, è auspicabile che ogni regione e Provincia Autonoma definisca una strategia di campionamento basata su un'analisi del rischio che tenga conto delle specificità territoriali.

Il prelievo dei campioni deve essere eseguito nel rispetto delle adeguate misure di biosicurezza. Resta fermo il principio secondo il quale, in fase di sorveglianza, è possibile adottare un livello di biosicurezza intermedio, ma comunque adeguato al caso e tale da garantire che tutti i campioni prelevabili possano essere sottoposti ai test di laboratorio.

Gli organi *target* da prelevare sono i medesimi elencati nel paragrafo precedente, in ordine di priorità di scelta. I campioni devono essere adeguatamente identificati attraverso etichetta e associata alla scheda generata dal Sistema Informativo Veterinario per la Sicurezza Alimentare (SINVSA).

In caso di positività al test di conferma, il flusso dati deve essere accompagnato dalla immediata comunicazione di positività per le vie brevi a tutte le istituzioni competenti, a partire dal Ministero della Salute. Il servizio veterinario della ASL localmente competente notifica la conferma del focolaio di infezione anche attraverso il SIMAN e adotta le misure previste dal Manuale delle emergenze in stretta collaborazione con le autorità competenti nazionali e regionali (Ministero della Salute, 2023).

Prelievo di organi/carcassa in caso di sospetto PSA in azienda suinicola

Il sospetto può essere formulato:

- Su base clinica: ogni qualvolta si rinvenivano sintomi riferibili a PSA ed in particolare
 - Aumentata mortalità, anche solo neonatale
 - Febbre (>41°C)
 - Lesioni emorragiche cutanee
 - Disturbi gastro intestinali accompagnati da perdite ematiche
 - Aborti
- Su base anatomopatologica: ogni qualvolta si rinvenivano lesioni riferibili a PSA ed in particolare
 - lesioni emorragiche cutanee
 - Lesioni emorragiche ad organi interni (milza, rene, linfonodi, tonsille)
- Su base epidemiologica: ogni qualvolta che un'azienda suinicola possa essere epidemiologicamente collegata in via diretta o indiretta a un focolaio o ad un caso di PSA.

Chiunque rinvenga un caso sospetto di PSA è tenuto ad avvertire tempestivamente il servizio veterinario della ASL localmente competente per territorio. Lo stesso servizio veterinario può emanare direttamente il sospetto in corso di sorveglianza negli stabilimenti suinicoli.

In ogni caso, una volta verificata la fondatezza del sospetto, il servizio veterinario della ASL localmente competente mette in atto quanto previsto dal Manuale delle emergenze a partire dal sopralluogo in azienda. In caso di sospetto il prelievo dei campioni deve essere eseguito adottando le necessarie misure di biosicurezza.

In caso di sospetto è necessario che il servizio veterinario della ASL localmente competente si attivi immediatamente per prelevare idonei campioni per i test di conferma sulle seguenti categorie di suini:

- Suini vivi a contatto con il sospetto: sangue EDTA/ siero;

- Suini malati/moribondi: sangue EDTA/siero;
- Suini morti in stalla: organi target.

Gli organi prelevati da ogni singolo animale, dopo essere stati opportunamente confezionati, devono essere adeguatamente identificati attraverso un'etichetta, in modo che il campione possa essere facilmente riconducibile alla scheda accompagnamento campioni scaricata sul SIMAN (Ministero della Salute, 2023).

Zona soggetta a restrizioni

Ai sensi dell'art. 19 del Decreto Legislativo 5 agosto 2022 n. 136, in caso di focolaio in suini detenuti, l'azienda sanitaria locale competente per territorio mette in atto le azioni previste dall'art. 60 del Regolamento (UE) 2016/429: dichiarare ufficialmente infetto lo stabilimento; stabilire una zona soggetta a restrizioni; attuare il piano di emergenza. In particolare, l'istituzione di una zona soggetta a restrizioni comprendente le zone di protezione e di sorveglianza, e deve tener conto del raggio minimo stabilito per queste zone.

La zona di protezione deve avere un'estensione di almeno 3 km di raggio, ai limiti di tale zona, su tutte le possibili vie di accesso vengono affissi appositi cartelli riportanti la dicitura: "zona di protezione peste suina classica/ peste suina africana".

La zona di sorveglianza invece, deve prevedere un'estensione di almeno 10 km di raggio, comprendente la zona di protezione. Ai limiti di tale zona, su tutte e possibili vie di accesso, vengono affissi cartelli riportanti la dicitura: "Zona di sorveglianza peste suina classica/ peste suina africana) (Ministero della Salute, 2022).

Territorio continentale infetto- piano di eradicazione per PSA

Le attività di sorveglianza passiva rafforzata nei cinghiali e nei domestici in linea generale si svolgono con modalità analoghe a quanto eseguito nei territori liberi dall'infezione.

Tuttavia, sussistono alcune differenze: nelle zone infette oltre alla routinaria attività di sorveglianza passiva sono previste anche attività di ricerca organizzata delle carcasse dei selvatici.

Tutte le attività di sorveglianza passiva devono essere eseguite nel rispetto di stringenti protocolli di biosicurezza. In particolare, le autorità regionali devono dotarsi di un adeguato protocollo tecnico di biosicurezza per lo svolgimento di tali attività, incluso lo smaltimento delle carcasse ritrovate, e devono prevedere l'esecuzione di campagne di formazione per gli operatori coinvolti.

Nelle zone infette, i laboratori degli II.ZZ.SS. competenti per territorio, successivamente alla conferma del primo caso, sono autorizzati ad eseguire test di conferma dei casi successivi rinvenuti, considerati sospetti perché direttamente collegati al caso indice. In pratica, in caso di positività ai test biomolecolari riscontrata su tali campioni dallo IZS competente per territorio, non è previsto l'invio dei campioni al CEREP e il servizio veterinario della ASL localmente competente procede direttamente alla notifica di caso o focolaio secondario di PSA (Ministero della Salute, 2022).

Sorveglianza attiva nei cinghiali

In linea generale, la sorveglianza attiva può essere svolta soltanto nelle zone di restrizione delle regioni infette con una tempistica definita nell'ambito del piano di eradicazione. Tra queste attività rientrano la eventuale installazione delle trappole per la cattura dei selvatici e le attività di depopolamento mediante tecniche a basso impatto, da applicarsi solo in seguito all'installazione delle recinzioni. Come per i cinghiali rinvenuti morti, anche tutti i cinghiali abbattuti, sia all'interno delle aree recintate, sia nelle restanti parti delle zone di restrizione, devono essere campionati e sottoposti ai test di laboratorio per PSA.

Come previsto dalle linee guida per le misure di biosicurezza per gli abbattimenti di cinghiali nelle zone sottoposte a restrizione per PSA, l'obiettivo degli abbattimenti del cinghiale all'interno delle zone sottoposte a restrizione è quello di contribuire alla riduzione della popolazione; tale attività sostituisce l'attività ludico-ricreativa che si svolge nei territori indenni (Ministero della Salute, 2022).

Contaminazione ambientale da parte degli utilizzatori delle foreste nelle aree endemiche della peste suina africana

È ormai assodato che il principale meccanismo epidemiologico che consente alla PSA di persistere nell'ambiente non è correlato tanto al contatto diretto tra individui vivi infetti e animali sensibili, ma è piuttosto dovuto alla funzione delle carcasse di cinghiali selvatici infetti e ad altre forme di contaminazione ambientale che agiscono come serbatoi di virus (Gervasi, et al., 2021).

Le carcasse, tuttavia, non sono l'unica matrice in cui il virus della PSA può sopravvivere per lunghi periodi: nei terreni sabbiosi, il virus può persistere per diverse settimane dopo che una carcassa è stata rimossa. E' stato anche dimostrato sperimentalmente che urina e feci agiscono come potenziale fonte

di infezione per 3-15 giorni dopo la deposizione, a seconda della stagione e della temperatura. Inoltre, sebbene sia stato dimostrato che i cinghiali selvatici e altre specie spazzini agiscono come potenziali vettori di contaminazione e diffusione della PSA non sono gli unici (Probst, et al., 2019)

Infatti, anche gli esseri umani visitano e utilizzano le foreste o ecosistemi silvestri sia per motivi ricreativi che professionali. L'escursionismo, la raccolta di funghi e bacche, la caccia e il disboscamento del legno sono esempi di intensa presenza umana nelle aree colpite dalla PSA. Alcune di queste attività forestali, come la caccia al cinghiale o l'alimentazione supplementare del cinghiale, sono direttamente orientate verso il serbatoio del virus di specie in tutta l'Eurasia, creando così una vicinanza spaziale tra molti utenti forestali e le fonti ambientali di contaminazione da PSA (urina, escrementi, sangue, ecc.). Poiché il virus della PSA può contaminare fomite, come vestiti, calzature e attrezzature, e persistere per lunghi periodi sulla loro superficie, dovrebbe essere considerato il potenziale rischio per gli utenti delle foreste di calpestare o toccare accidentalmente materiale infetto e di agire come vettore ASF involontariamente (Mazur-Panasiuk, et al., 2019).

Nello studio condotto da Gervasi (Gervasi, et al., 2022) sono stati considerati cinque diversi tipi di “uso forestale” per valutare come queste attività possano veicolare la diffusione antropogenica del virus:

1. Movimento di singoli utenti della foresta, come raccoglitori di funghi/bacche, escursionisti, corridori, ecc.;
2. Caccia collettiva al cinghiale, eseguita da un gruppo di cacciatori che si muovono in linee parallele in un terreno di caccia predefinito;
3. Caccia individuale al cinghiale, effettuata da un solo cacciatore, guidato dai cani verso l'home range del cinghiale più vicino;
4. Disboscamento del legno, eseguito da un gruppo di lavoratori forestali in una zona forestale relativamente piccola, ma intensamente utilizzata;
5. Visite periodiche a un sito di alimentazione dei cinghiali, per il rifornimento di cibo.

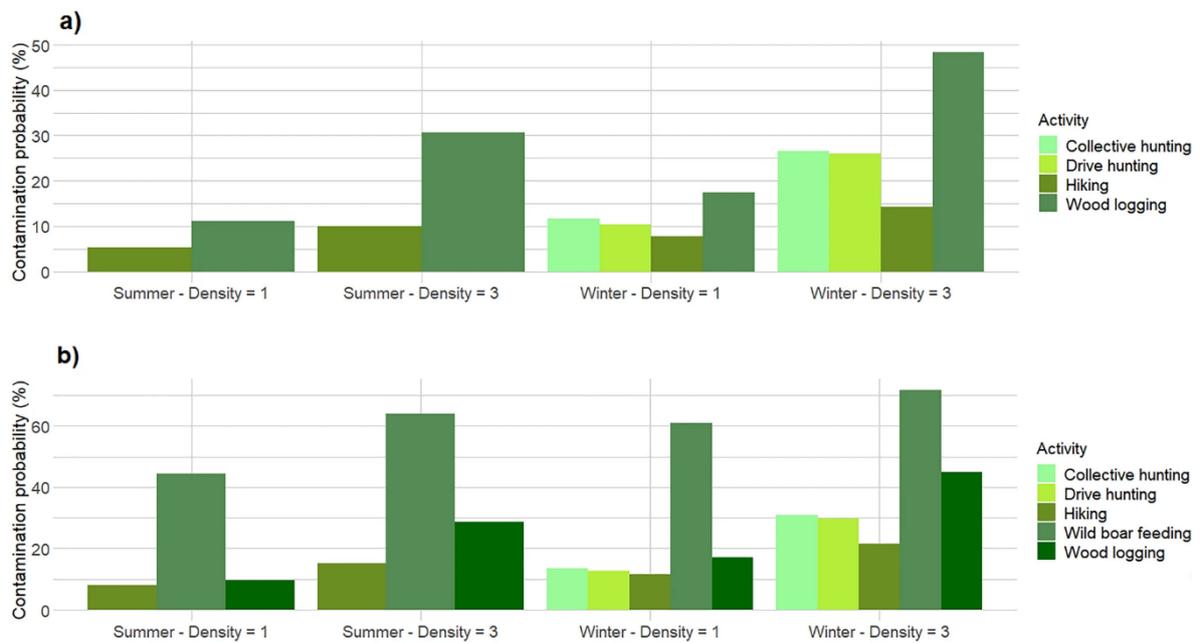


Figura 10-Probabilità di contaminazione ambientale della peste suina africana, corrispondente a una camminata simulata di 1 km in un percorso di 50 km² di foresta in cui la PSA è endemica (prevalenza = 2%). Le probabilità di contaminazione sono espresse in percentuale e sono previste per cinque tipi di uso forestale, a diverse densità di cinghiali e in diverse stagioni, senza (a) e con (b) alimentazione artificiale del cinghiale (Gervasi, et al., 2022)

Dalla (Figura 10) se ne deduce che dovrebbe essere limitata fortemente o, meglio ancora, evitata l'alimentazione supplementare dei cinghiali nelle aree colpite dalla PSA, poiché tali pratiche generano un alto rischio di contaminazione e causano una concentrazione spaziale di materiali biologici potenzialmente infetti, con conseguenze negative sulla capacità di confinare gli animali infetti da PSA.

Andrebbero inoltre valutati seriamente i compromessi associati all'uso della caccia al cinghiale come strumento di gestione nelle aree colpite dalla PSA, con l'obiettivo di valutare se i suoi benefici (sorveglianza attiva della PSA e limitazione della popolazione) superano i rischi di contaminazione ambientale della PSA e diffusione mediata dall'uomo. Inoltre, considerando la rilevanza dei rischi di contaminazione da PSA negli ambienti forestali, dovrebbero essere definite e applicate rigorose misure di biosicurezza nelle aree colpite dalla PSA, non solo per le persone la cui presenza nella foresta è correlata alla caccia al cinghiale, ma per tutti i visitatori e i lavoratori che potenzialmente svolgono un ruolo nella diffusione del virus (Gervasi, et al., 2022).

Nel complesso, questi risultati evidenziano come gli esseri umani possano svolgere un ruolo rilevante, anche se non intenzionale, nella diffusione del virus della PSA, quando si utilizzano aree forestali con cinghiali selvatici infetti da PSA. Chiaramente questo ruolo dovrebbe essere meglio stimato e quantificato per ciascun contesto locale e preso in considerazione quando si pianifica la gestione dei cinghiali o, più in generale, la gestione delle foreste nelle aree colpite dalla PSA (Gervasi, et al., 2022).

Conclusione

Il presente elaborato riporta un'analisi il più completa possibile del contesto epidemiologico mondiale attuale del virus della Peste Suina Africana (ASFV), evidenziando la sua diffusione nel corso degli anni, con una prima introduzione in Europa che ha interessato il Portogallo e la Sardegna e, successivamente una seconda propagazione dai paesi dell'Est Europa; contemporaneamente alla sua circolazione e diffusione in America, Cina e Sud-Est Asiatico e infine la sua costante presenza nel continente africano.

Sono state inoltre evidenziate le differenze e le similitudini nelle manifestazioni cliniche, nella diffusione e nella mortalità tra suino domestico e cinghiale, a seconda del genotipo circolante. Chiaramente, questo agente virale dimostra un forte impatto economico nel settore suinicolo, in ragione della mortalità degli animali (tasso di mortalità), a causa della malattia e al conseguente abbattimento dei restanti capi dell'allevamento; soprattutto nei paesi come l'Italia, dove vengono lavorati molti prodotti tipici rinomati a base di carne suina, oppure la Cina, che esporta notevoli quantità di carne e ha una elevatissima concentrazione di questa specie sul territorio nazionale.

Assume notevole importanza anche la circolazione di ASFV all'interno del ciclo silvestre, che vede coinvolti i cinghiali in Europa e diversi suidi selvatici in Africa, rappresentando il principale serbatoio virale. Oltre a questi animali, è stato ampiamente confermato come anche gli altri utilizzatori del bosco (uomo compreso) possano essere coinvolti, involontariamente, nella diffusione virale, motivo per cui le linee guida nazionali vietano/ limitano la circolazione nei boschi in aree infette.

ASFV presenta una struttura e un meccanismo di evasione immunitaria attualmente non del tutto noti, fatto questo che rende estremamente complicato lo sviluppo di una idonea ed efficace terapia vaccinale. La poca applicabilità della vaccinazione nei selvatici e la difficoltà della loro stessa gestione, è dovuto anche all'habitat e all'impossibilità di effettuare un vero censimento della popolazione, a differenza della vaccinazione nei suini domestici, che presenta meno problematiche pratiche. Tuttavia, la strategia di contenimento della diffusione virale dovrà sempre essere coadiuvata da un'elevata biosicurezza e disinfezione degli ambienti e delle attrezzature; anche se, al momento, non sono noti vaccini efficaci nel contrastare ASFV.

A conclusione di questa ricerca possiamo affermare che, la gestione dell'emergenza sanitaria, causata dalla PSA, deve essere affrontata con approccio globale ed integrato, applicando efficienti misure di prevenzione, per evitare l'introduzione del virus sul territorio e il suo conseguente mantenimento nel ciclo silvestre. Ogni strategia sanitaria deve essere svolta in sinergia con le adeguate misure di eradicazione negli allevamenti colpiti, in attesa di una profilassi vaccinale efficace o altra terapia, al fine di tutelare: in primis il benessere animale e infine anche il settore economico delle produzioni animali, di cui il comparto suinicolo è senza alcun dubbio uno dei maggiori esponenti in un'ottica One Health.

Bibliografía

1. AFSCA African Swine Fever. [Journal]. - 2020. - <http://www.afsca.be/asp/aktualitat/belgien/>.
2. Ahmed J A H, M., Aksin e U. Seitzer Current status of ticks in Asia. [Journal]. - [s.l.] : Parasitol. Res., 2007. - 101(Suppl. 1), 159–162.
3. Alcamí A, A.L. Carrascosa e E. Viñuela he entry of African swine fever virus into Vero cells. [Journal]. - [s.l.] : Virology , 1989. - 171, 68–75.
4. Alcamiz A, A.L. Carrascosa e E. Vinuela Interaction of African swine fever virus with macrophages [Journal]. - [s.l.] : Virus Res., 1990. - 17:93–104. doi: 10.1016/0168-1702(90)90071-I.
5. Alejo A [et al.] A Proteomic Atlas of the African Swine Fever Virus Particle [Journal]. - [s.l.] : J Virol, 2018. - 92:e01293–18. doi: 10.1128/JVI.01293-18.
6. Alguero FJ [et al.] Apoptosis of thymocytes in experimental Africa Swine Fever virus infection. [Journal]. - [s.l.] : Histol Histopathol., 2004. - 19:77–84. doi: 10.14670/HH-19.77.
7. Almazan F. [et al.] Transcriptional analysis of multigene family 110 of African swine fever virus [Journal]. - [s.l.] : J. Virol, 1992. - Vol. 66.
8. Alonso C. [et al.] ICTV virus taxonomy profile: asfarviridae [Journal]. - [s.l.] : J. Gen. Virol, 2018. - Vol. 99.
9. Anderson E.C. [et al.] African swine fever virus infection of the bushpig (*Potamochoerus porcus*) and its significance in the epidemiology of the disease [Sezione di libro]. - [s.l.] : Veterinary Microbiology, 62 (1), 1998.
10. Andres G [et al.] African swine fever virus structural protein pE120R is essential for virus transport from assembly sites to plasma membrane but not for infectivity. [Journal]. - [s.l.] : J Virol, 2001. - 5:6758–68. doi: 10.1128/JVI.75.15.6758-6768.2001.
11. Andres G. [et al.] African swine fever virus structural protein pE120R is essential for virus transport from assembly sites to plasma membrane but not for infectivity [Journal]. - [s.l.] : Journal of Virology, 2001. - Vol. 75.
12. Andres G. [et al.] The cryo-EM structure of African swine fever virus unravels a unique architecture comprising two icosahedral protein capsids and two lipoprotein membranes [Journal]. - [s.l.] : J. Biol. Chem, 2020. - Vol. 295.
13. Anon Eradication program of African swine fever in Spain Madrid [Journal]. - [s.l.] : pain: Ministerio de Agricultura-Pesce y Alimentacion, Direccion General de la Produccion Agraria, Subdireccion General de Sanidad Animal , 1990.
14. Arias M, A. de la Torre e L. Dixon Approaches and Perspectives for Development of African Swine Fever Virus [Journal]. - [s.l.] : Vaccines, 2017. - 5:35.
15. Arias M, A. de la Torre e L. Dixon Approaches and Perspectives for Development of African Swine Fever Virus Vaccines [Journal]. - [s.l.] : Vaccines , 2017. - 5:35.

16. Balysheva VI, E.Y.U. Prudnikova e T.V. Galnbek Immunological properties of attenuated variants of African swine fever virus isolated in the Russian Federation. [Journal]. - [s.l.] : Russian Agric Sci., 2015. - 2015;41:2.
17. Barderas MG, F. Rodríguez e P. Gómez-Puertas Antigenic and immunogenic properties of a chimera of two immunodominant African swine fever virus proteins. [Journal]. - [s.l.] : Arch Virol , 2001. - 146:1681–1691.
18. Bartolo I Di [et al.] Detection of hepatitis E virus in pork liver sausages [Journal]. - [s.l.] : Int. J. Food Microbiol., 2015. - pp. 29-33.
19. Basta S. [et al.] Cellular processes essential for African swine fever virus to infect and replicate in primary macrophages [Journal]. - [s.l.] : Vet. Microbiol., 2010. - Vol. 140.
20. Bastos A.D.S. [et al.] Genotyping field strains of African swine fever virus by partial p72 gene characterisation [Sezione di libro]. - [s.l.] : Archives of Virology, 2003.
21. Beato MS [et al.] Disinfectants against African Swine Fever: An Updated Review [Journal]. - [s.l.] : Viruses , 2022. - 14(7), 1384.
22. Beltrán-Alcrudo D [et al.] African Swine Fever Spread in the Russian Federation and the Risk for the Region. [Journal]. - Roma : EMPRES watch, FAO,, 2009.
23. Beltran-Alcrudo D [et al.] African Swine Fever in the Caucasus [Journal]. - Roma : EMPRES watch, FAO,, 2008.
24. Beuret M, S. Michel e P. Woods La Chinafrrique: Pékin à la conquête du continent noir Paris [Atti di convegno] // France: Grasset & Fasquelle. - 2008.
25. Blagodarnosti [Atti di convegno] // 19th Veterinary Congress Russian Veterinary Association. - Moscow : [s.n.], 2011.
26. Blome S, C. Gabriel e M. Beer Modern adjuvants do not enhance the efficacy of an inactivated African swine fever virus vaccine preparation [Journal]. - [s.l.] : Vaccine, 2014. - 32:3879–3882.
27. Blome S, C. Gabriel e M. Beer Pathogenesis of African swine fever in domestic pigs and European wild boar [Journal]. - [s.l.] : Virus Res., 2013. - 173:122–30. doi: 10.1016/j.virusres.2012.10.026.
28. Blome S., K. Franzke e M. Beer African swine fever – A review of current knowledge [Libro]. - Germany : Virus Research, 2020.
29. Blome Sandra, Kati. Franzke e Martin. Bee African swine fever – A review of current knowledge [Journal]. - [s.l.] : Virus Research, 2020. - Vol. 287.
30. Boinas FS [et al.] Characterization of pathogenic and non-pathogenic African swine fever virus isolates from *Ornithodoros erraticus* inhabiting pig premises in Portugal. [Journal]. - [s.l.] : J Gen Virol. , 2004. - Vol. 85(Pt 8):2177–87. doi: 10.1099/vir.0.80058-0.
31. Boinas FS [et al.] The persistence of African swine fever virus in field-infected *Ornithodoros erraticus* during the ASF endemic period in Portugal. [Journal]. - [s.l.] : PLoS ONE, 2011. - 6:e20383. doi: 10.1371/journal.pone.0020383.

32. Borca MV [et al.] La delezione di un gene simile al CD2, 8-DR, dal virus della peste suina africana influisce sull'infezione virale nei suini domestici [Journal]. - [s.l.] : J Virol, 1998. - 72:2881–9. DOI: 10.1128/JVI.72.4.2881-2889.1998.
33. Borca MV, E. Ramirez-Medina e E. Silva ASFV-G-ΔI177L as an Effective Oral Nasal Vaccine against the Eurasia Strain of Africa Swine Fever [Journal]. - [s.l.] : Viruses, 2021.
34. Borca MV, E. Ramirez-Medina e E. Silva Development of a Highly Effective African Swine Fever Virus Vaccine by Deletion of the I177L Gene Results in Sterile Immunity against the Current Epidemic Eurasia Strain [Journal]. - [s.l.] : J Virol, 2020.
35. Bosch J [et al.] Retrospective spatial analysis for African swine fever in endemic areas to assess interactions between susceptible host populations [Journal]. - [s.l.] : PLoS ONE, 2020. - 15, e0233473.
36. Botija C. Sanchez Reservoirs of African swine fever virus/a study of the African swine fevere virus in arthropods by means of haemadsorption [Sezione di libro]. - [s.l.] : Bulletin de l'Office International des Epizooties, 1963.
37. Boxel-Dezaire A.H van, M.R. Rani e G.R. Stark Complex modulation of cell type-specific signaling in response to type I interferons [Journal]. - [s.l.] : Immunity., 2006. - Vol. 25.
38. Breese S.S. e C.J. DeBoer Electron microscope observations of African swine fever virus in tissue culture cells [Journal]. - [s.l.] : Virology,, 1966. - Vol. 28.
39. Brun A [et al.] African swine fever virus gene A179L, a viral homologue of bcl-2, protects cells from programmed cell death [Journal]. - [s.l.] : Virology, 1996. - 225:227–30. doi: 10.1006/viro.1996.0592.
40. Cackett G, M. Sýkora e F. Werner Transcriptome view of a killer: African swine fever virus. [Journal]. - [s.l.] : Biochem. Soc. Trans, 2020. - Vol. 48, 1569–1581.
41. Cappai S [et al.] Evaluation of biological and socio-economic factors related to persistence of African swine fever in Sardinia. [Journal]. - [s.l.] : Prev. Vet. Med, 2018. - 152, 1–11.
42. Carrasco L [et al.] African swine fever: Expression of interleukin-1 alpha and tumour necrosis factor-alpha by pulmonary intravascular macrophages. [Journal]. - [s.l.] : J Comp Pathol., 2002. - 126:194–201. doi: 10.1053/jcpa.2001.0543.
43. Carrasco L [et al.] Development of microscopic lesions in splenic cords of pigs infected with African swine fever virus. [Journal]. - [s.l.] : Vet Res, 1997. - 28:93–9..
44. Carrasco L [et al.] ican swine fever: Expression of interleukin-1 alpha and tumour necrosis factor-alpha by pulmonary intravascular macrophages. [Journal]. - [s.l.] : J Comp Pathol, 2002. - 126:194–201. doi: 10.1053/jcpa.2001.0543.
45. Carrasco L [et al.] The pathogenic role of pulmonary intravascular macrophages in acute African swine fever [Journal]. - [s.l.] : Res Vet Sci, 1996. - 61:193–8. doi: 10.1016/S0034-5288(96)90062-4.
46. Carrascosa A.L. [et al.] Localization of the African swine fever virus attachment protein P12 in the virus particle by immunoelectron microscopy [Journal]. - [s.l.] : Virology, 1993. - Vol. 193.

47. Carrascosa J.L. [et al.] General morphology and capsid fine structure of African swine fever virus particles [Journal]. - [s.l.] : Virology, 1984. - 132.
48. Chapman David A G [et al.] Comparison of the genome sequences of non-pathogenic and pathogenic African swine fever virus isolates [Journal]. - [s.l.] : 1 Journal of General Virology, 2008. - 2 : Vol. 89.
49. Charlier J [et al.] Disease control tools to secure animal and public health in a densely populated world [Journal]. - [s.l.] : The lancet, Planetary Health, 2022. - [https://doi.org/10.1016/S2542-5196\(22\)00147-4](https://doi.org/10.1016/S2542-5196(22)00147-4).
50. Chatterjee P Haiti's forgotten emergency [Journal]. - [s.l.] : Lancet, 2008. - [http://dx.doi.org/doi:10.1016/S0140-6736\(08\)61259-3](http://dx.doi.org/doi:10.1016/S0140-6736(08)61259-3).
51. Chen W [et al.] A seven-gene-deleted African swine fever virus is safe and effective as a live attenuated vaccine in pigs [Journal]. - [s.l.] : Sci China Life Sci., 2020. - 63:623–34. [10.1007/s11427-020-1657-9](https://doi.org/10.1007/s11427-020-1657-9).
52. Ciza A. MushagalusaI, Eric EtterII. III e PenrithI Mary-Louise Review of African swine fever outbreaks history in South Africa: From 1926 to 2018 [Journal]. - Pretoria : Onderstepoort Journal of Veterinary Research, 2021. - Vol. vol.88 n.1 .
53. Colpitts CC [et al.] 5-(Perylen-3-yl)ethynyl-arabino-uridine (aUY11), an arabino-based rigid amphipathic fusion inhibitor, targets virion envelope lipids to inhibit fusion of influenza virus, hepatitis C virus, and other enveloped viruses. [Journal]. - [s.l.] : J. Virol., 2013. - 87.
54. Cordon SanchezPJ [et al.] Role of hepatic macrophages during the viral hemorrhagic fever induced by African Swine Fever Virus [Journal]. - [s.l.] : Histol Histopathol., 2008. - 23:683–91. doi: 10.14670/HH-23.683.
55. Costard S [et al.] African swine fever: how can global spread be prevented? [Journal]. - [s.l.] : Phil. Trans., 2009. - 364, 2683– 2696.
56. Costard S [et al.] Epidemiologia del virus della peste suina africana. [Journal]. - [s.l.] : Virus Res, 2013. - 173:191–7. DOI: 10.1016/j.virusres.2012.10.030.
57. Costard S [et al.] Introduction of African swine fever into the European Union through illegal importation of pork and pork products [Journal]. - [s.l.] : PLoS One, 2013.
58. Costard S. [et al.] African swine fever: how can global spread be prevented? [Sezione di libro]. - [s.l.] : Philosophical Transactions from the Royal Society of London B (364) , 2009.
59. Covadonga Alonso [et al.] ICTV Virus Taxonomy Profile: Asfarviridae [Journal]. - [s.l.] : Journal of General Virology, 2018. - 5 : Vol. 99.
60. Cristina Suárez, María L Salas e Javier M Rodríguez African swine fever virus polyprotein pp62 is essential for viral core development [Journal]. - [s.l.] : Journal of virology, 2010.
61. Cuesta-Geijo M.A. [et al.] Endosomal maturation, Rab7 GTPase and phosphoinositides in African swine fever virus entry [Journal]. - [s.l.] : PLoS One, 2012. - Vol. 7.
62. Dellicour S [et al.] Unravelling the dispersal dynamics and ecological drivers of the African swine fever outbreak in Belgium [Journal]. - [s.l.] : J. Appl. Ecol., 2020.

63. Destoumieux-Garzón D, P. Mavingui e G. Boetsch The One Health Concept: 10 years old and a long road ahead. [Journal]. - [s.l.] : Front Vet Sci, 2018. - 5:14.
64. Díaz S, J. Settele e E. Brondizio Summary for policymakers of the global assessment report on biodiversity and ecosystem services of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services. [Journal]. - Germany : Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services, 2019.
65. Dixon L K, H. Sole e H. Roberts African Swine Fever. [Journal]. - [s.l.] : Antiviral Res, 2019. - 165, 34–41.
66. Dixon L.K. [et al.] African swine fever epidemiology and control [Journal]. - [s.l.] : Annu. Rev. Anim. Biosci, 2020. - Vol. 8.
67. Dixon L.K. [et al.] Asfarviridae Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses [Journal]. - Londra : Elsevier, 2012.
68. Dixon Linda K. [et al.] African Swine Fever Epidemiology and Control [Journal]. - [s.l.] : Annual Review of Animal Biosciences, 2019. - Vol. Vol. 8:221-246 .
69. Dixon LK [et al.] African swine fever virus replication and genomics [Journal]. - [s.l.] : Virus Res, 2013. - 173:3–14. doi: 10.1016/j.virusres.2012.10.020.
70. Dixon LK [et al.] Replicazione e genomica del virus della peste suina africana. [Journal]. - [s.l.] : Virus Res , 2013. - 173:3–14. DOI: 10.1016/j.virusres.2012.10.020.
71. Dixon LK e H. Sun, H., Roberts African swine fever [Journal]. - [s.l.] : Antiviral Res, 2019. - 165:34–41. doi: 10.1016/j.antiviral.2019.02.018.
72. Dixon LK, H. Sun e H. Roberts African swine fever. [Journal]. - [s.l.] : Antivir. Res, 2019. - 165.
73. EFSA European Food Safety Authority Scientific opinion on African swine fever [Journal]. - [s.l.] : EFSA J., 2010. - 1556 : Vol. 8.
74. EFSA European Food Safety Authority Scientific opinion on African swine fever. [Journal]. - [s.l.] : EFSA J, 2010. - 8, 1556..
75. Endris RG e WR. Hess Attempted transovarial and venereal transmission of African swine fever virus by the Iberian soft tick ornithodoros (*Pavlovskyella*) marocanus (Acari: Ixodoidea: Argasidae). [Journal]. - [s.l.] : J Med Entomol., 1994. - 31:373–81. doi: 10.1093/jmedent/31.3.373.
76. Endris RG, TM. Haslett e WR. Hess Experimental transmission of African swine fever virus by the tick *Ornithodoros* (*Alectorobius*) *puertoricensis* (Acari: Argasidae) [Journal]. - [s.l.] : J Med Entomol, 1991. - 28:854–8. doi: 10.1093/jmedent/28.6.854.
77. Escribano J M, I. Galindo e C. Alonso Antibody-mediated neutralization of African swine fever virus: Myths and facts [Journal]. - [s.l.] : Virus Res., 2013. - 173, 101–109.
78. Escribano JM, I. Galindo e C. Alonso Antibody-mediated neutralization of African swine fever virus: myths and facts. [Journal]. - [s.l.] : Virus Res, 2023. - 173:101–109.
79. Esteves A., M.I. Marques e J.V. Costa Two-dimensional analysis of African swine fever virus proteins and proteins induced in infected cells [Journal]. - [s.l.] : Virology, 1986. - Vol. 152.

80. Etter E. [et al.] Seroprevalence of African Swine Fever in Senegal, 2006 [Journal]. - [s.l.] : Emerging infectious diseases, 2011. - pp. 49-54 : Vol. 17 (1).
81. European Union Council Directive (2002/99/EC) of 16 December 2002 Laying down the animal health rules governing the production, processing, distribution and introduction of products of animal origin for human consumption [Journal]. - [s.l.] : Off. J. Eur. Commun, 2002. - pp. 11-19.
82. European Union EU Regulation on animal by-products not intended for human consumption. [Journal]. - 2002. - (http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2002R1774:20070724:EN:PDF).
83. Farez S e R.S. Morley Potential animal health hazard of pork and pork products [Journal]. - [s.l.] : Rev. Sci. Technol., 1997. - pp. 65-78.
84. FAS USDA (Foreign Agricultural Service–United States Department of Agriculture) Livestock and poultry: world market and trade. [Journal]. - 2006.
85. Forth J H [et al.] Comparative Analysis of Whole-Genome Sequence of African Swine Fever Virus Belgium 2018/1 [Journal]. - [s.l.] : Emerg. Infect. Dis, 2019. - 25, 1249–1252..
86. Forth J.H. [et al.] Comparative analysis of whole-genome sequence of african swine fever virus Belgium 2018/1 [Journal]. - [s.l.] : Emerg Infect Dis, 2019. - Vol. 25.
87. Fowler M E Husbandry and diseases of captive wild swine and peccaries [Journal]. - [s.l.] : Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epizoot, 1996. - 15, 141–154 .
88. Frant M, G. Wozniakowski e Z. Pejsak African Swine Fever (ASF) and Ticks. No risk of tick-mediated ASF spread in Poland and Baltic states [Journal]. - [s.l.] : J Vet Res. , 2017. - Vol. 61:375–80. doi: 10.1515/jvetres-2017-0055.
89. Franzoni G [et al.] African Swine Fever Circulation among Free-Ranging Pigs in Sardinia: Data from the Eradication Program [Journal]. - [s.l.] : Vaccines , 2020. - https://doi.org/10.3390/vaccines8030549.
90. Gabriel C [et al.] Characterization of African swine fever virus Caucasus isolate in European wild boars. [Journal]. - 2011. - 17:2342–5. doi: 10.3201/eid1712.110430 : Vol. Emerg Infect Dis.
91. Galindo I [et al.] Comparative inhibitory activity of the stilbenes resveratrol and oxyresveratrol on African swine fever virus replication. [Journal]. - [s.l.] : Antivir. Res, 2011. - 91.
92. Galindo I Alonso C. African swine fever virus: a review. Viruses [Journal]. - [s.l.] : Viruses., 2017. - 9:E103. doi: 10.3390/v9050103.
93. Galindo I. [et al.] African swine fever virus infects macrophages, the natural host cells, via clathrin- and cholesterol-dependent endocytosis [Journal]. - [s.l.] : Virus Res, 2015. - Vol. 200.
94. Gallardo C [et al.] Enhanced discrimination of African swine fever virus isolates through nucleotide sequencing of the p54, p72, and pB602L (CVR)genes [Journal]. - [s.l.] : Vir. Gen., 2009. - 38, 85– 95..
95. Gallardo C, A. Soler e I. Rodze Attenuated and non-haemadsorbing (non-HAD) genotype II African swine fever virus (ASFV) isolated in Europe, Latvia 2017. [Journal]. - [s.l.] : Transbound Emerg Dis , 2019. - 66:1399–1404.

96. Gallardo C. [et al.] Maggiore discriminazione degli isolati del virus della peste suina africana attraverso il sequenziamento nucleotidico dei geni p54, p72 e pB602L (CVR) [Journal]. - [s.l.] : Virus Genes, 2009. - Vol. 38.
97. Garcia-Escudero R. [et al.] Inducible gene expression from African swine fever virus recombinants: analysis of the major capsid protein p72 [Journal]. - [s.l.] : Journal of Virology, 1998. - Vol. 72.
98. Gaudreault N Natasha [et al.] African Swine Fever Virus: An Emerging DNA Arbovirus [Journal]. - [s.l.] : Sec. Veterinary Infectious Diseases, 2020. - Vol. 7.
99. Gavier-Widén D [et al.] African swine fever in wild boar in Europe: A notable challenge [Journal]. - [s.l.] : Vet. Rec., 2015. - 76:199–200. doi: 10.1136/vr.h699.
100. Ge S [et al.] Molecular characterization of African Swine Fever virus, China, 2018 [Journal]. - [s.l.] : Emerging Infectious Diseases, 2018. - 24(11), 2131. <https://doi.org/10.3201/eid2411.181274>.
101. Gervasi V e V. Guberti African swine fever endemic persistence in wild boar populations: key mechanisms explored through modelling [Journal]. - [s.l.] : Transbound Emerg Dis, 2021. - 68:2812–25.
102. Gervasi V, A. Marcon e V. Guberti Estimating the risk of environmental contamination by forest users in African Swine Fever endemic areas [Journal]. - [s.l.] : Acta Veterinaria Scandinavica, 2022. - 64:16.
103. Giammarioli M [et al.] Genetic characterisation of African swine fever viruses from recent and historical outbreaks in Sardinia (1978-2009) [Journal]. - 2011. - 42:377–87. doi: 10.1007/s11262-011-0587-7 : Vol. Virus Genes.
104. Goatley LC Reis AL, Portugal R, A pool of eight virally vectored African swine fever antigens protect pigs against fatal disease [Journal]. - [s.l.] : Vaccines, 2020. - 8:1–25..
105. Gogin A [et al.] African swine fever in the North Caucasus region and the Russian Federation in years 2007-2012. [Journal]. - [s.l.] : Virus Res, 2013. - Vol. (2013) 173:198–203. doi: 10.1016/j.virusres.2012.12.007.
106. Golnar AJ [et al.] Reviewing the potential vectors and hosts of african swine fever virus transmission in the United States [Journal]. - [s.l.] : Vector Borne Zoonotic Dis., 2019. - 19:512–24. doi: 10.1089/vbz.2018.2387.
107. Gómez-Puertas P, F. Rodríguez e J.M. Oviedo The African swine fever virus proteins p54 and p30 are involved in two distinct steps of virus attachment and both contribute to the antibody-mediated protective immune response. [Journal]. - [s.l.] : Virology, 1998. - 243:461–471.
108. Gomez-Villamandos JC [et al.] African swine fever and classical swine fever: a review of the pathogenesis [Journal]. - [s.l.] : Dtsch Tierarztl Wochenschr, 2003. - 110:165–9..
109. Gomez-Villamandos JC [et al.] Experimental African swine fever: apoptosis of lymphocytes and virus replication in other cells [Journal]. - [s.l.] : J Gen Virol, 1995. - 76:2399–405. doi: 10.1099/0022-1317-76-9-2399.

110. Gomez-Villamandos JC [et al.] Pathology of African swine fever: the role of monocytemacrophage. [Journal]. - [s.l.] : Virus Res, 2013. - 173:140–9. doi: 10.1016/j.virusres.2013.01.017.
111. Gomez-Villamandos JC [et al.] Thrombocytopenia associated with apoptotic megakaryocytes in a viral hemorrhagic syndrome induced by a moderately virulent strain of African swine fever virus [Journal]. - [s.l.] : Comp Pathol, 1998. - 118:1–13. doi: 10.1016/S0021-9975(98)80023-6.
112. Gomez-Villamandos JC Bautista MJ, Hervas J, Carrasco L, de Lara FC, Perez J, Subcellular changes in platelets in acute and subacute African swine fever. [Journal]. - [s.l.] : J Comp Pathol, 1996. - 115:327–41. doi: 10.1016/S0021-9975(96)80069-7.
113. Gray JS, A. Estrada-Peña e L. Vial Ecology of nidicolous ticks [Journal]. - New York: Oxford Univ. Press : Biology of Ticks,, 2014. - pp. 39–60. : Vol. Vol. 2.
114. Greig A Pathogenesis of African swine fever in pigs naturally exposed to the disease [Journal]. - [s.l.] : J Comp Pathol, 1972. - 82:73–9. doi: 10.1016/0021-9975(72)90028-X.
115. Guarino H, R.B. Cox e D.P. Patnayak Survival of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in pork products [Journal]. - [s.l.] : Food Environ. Virol, 2013. - pp. 157-161.
116. Guinat C [et al.] Transmission routes of African swine fever virus to domestic pigs: current knowledge and future research directions. [Journal]. - 2016. - 178:262–7. doi: 10.1136/vr.103593 : Vol. Vet Rec..
117. Haas B [et al.] Inactivation of Viruses in Liquid Manure [Journal]. - [s.l.] : Rev. Sci. Tech. , 1995. - 14, 435–445.
118. Hakobyan A. [et al.] Rigid amphipathic fusion inhibitors demonstrate antiviral activity against African swine fever virus [Journal]. - [s.l.] : J. Gen. Virol, 2018. - 99.
119. Haresnape J.M., S.A. Lungu e F.D. Mamu A four year survey of African swine fever in Malawi [Sezione di libro]. - (London) : Journal of Hygiene, 1985.
120. Hartog den L Developments in global pig production. [Journal]. - [s.l.] : Adv. Pork Prod, 2004. - 15, 17–24.
121. Hess WR [et al.] Clearance of African swine fever virus from infected tick (Acari) colonies [Journal]. - [s.l.] : J Med Entomol., 1989. - 26:314–7. doi: 10.1093/jmedent/26.4.314.
122. Heuschele WP Studies on the pathogenesis of African swine fever. I. Quantitative studies on the sequential development of virus in pig tissues [Journal]. - [s.l.] : Arch Gesamte Virusforsch, 1967. - 21:349–56. doi: 10.1007/BF01241735.
123. Heuschele WP Studies on the pathogenesis of African swine fever. I. Quantitative studies on the sequential development of virus in pig tissues [Journal]. - [s.l.] : Arch Gesamte Virusforsch., 1967. - 21:349–56. doi: 10.1007/BF01241735.
124. Hoelzer K, L. Bielke e D.P. Blake Vaccines as alternatives to antibiotics for food producing animals. Part 1: challenges and needs. [Journal]. - [s.l.] : Vet Res. , 2018. - 49: 64.
125. Iglesias I [et al.] Spatio-temporal Analysis of African Swine Fever in Sardinia (2012–2014): Trends in Domestic Pigs and Wild Boar. [Journal]. - [s.l.] : Transbound. Emerg. Dis, 2017. - 64, 656–662..

126. Iscaro C [et al.] January 2022: Index case of new African Swine Fever incursion in mainland Italy [Journal]. - [s.l.] : Transboundary and Emerging Diseases, 2022. - p. 1707-1711 : Vol. 69.
127. Italian Ministry of Health Decreto dirigenziale recante 'Istituzione di una zona infetta a seguito di conferma di casi di peste suina africana nei selvatici [Journal]. - 2022. - <https://www.trovanorme.salute.gov.it/norme/renderNormsanPdf?anno=2022&codLeg=85035&parte=1%20&serie=null>.
128. Jenson JS, A. Childerstone e H-H. Takamatsu The cellular immune recognition of proteins expressed by an African swine fever virus random genomic library. [Journal]. - [s.l.] : J Immunol Methods , 2000. - 242:33–42.
129. Jori F [et al.] Review of the sylvatic cycle of African swine fever in sub-Saharan Africa and the Indian ocean [Sezione di libro]. - [s.l.] : Virus research, 2013.
130. Jori F [et al.] Review of the sylvatic cycle of African swine fever in sub-Saharan Africa and the Indian Ocean [Journal]. - [s.l.] : Virus Res, 2013. - Vol. 173:212–27.
131. Jori F. e A.D.S. Bastos Role of wild suids in the epidemiology of African swine fever [Sezione di libro]. - [s.l.] : EcoHealth, 6, 2009.
132. Jori F. e A.D.S. Bastos Role of wild suids in the epidemiology of African swine fever [Journal]. - [s.l.] : EcoHealth, 2009. - pp. 296-310 : Vol. 6.
133. Jouvenet N [et al.] Transport of African swine fever virus from assembly sites to the plasma membrane is dependent on microtubules and conventional kinesin. [Journal]. - [s.l.] : J Virol., 2004. - 78:7990–8001. doi: 10.1128/JVI.78.15.7990-8001.2004.
134. Kim S.H [et al.] Wild boar harbouring African swine fever virus in the demilitarized zone in South Korea 2019 [Libro]. - [s.l.] : Emerg. Microbes Infect, 2020.
135. Kleiboeker SB [et al.] African swine fever virus infection in the argasid host, Ornithodoros porcinus porcinu [Journal]. - [s.l.] : J Virol., 1998. - 72:1711–24. doi: 10.1128/JVI.72.3.1711-1724.1998.
136. Kock G. De, E. Robinson e J.O.J.V.S.A.I. Keppel Swine fever in South Africa [Sezione di libro]. - [s.l.] : Onderstepoort Journal of Veterinary Science and Animal Industry, 1940.
137. Kolbasov D [et al.] African swine fever virus [Sezione di libro]. - Siberia, Russia : Emerging infectious, 2018.
138. Konno S [et al.] Spleen pathology in African swine fever. [Journal]. - 1972. - 62:486–506. : Vol. Cornell Vet..
139. L Mur M., Atzeni [et al.] thirty-Five-Year Presence of African Swine Fever in Sardinia: History, Evolution and Risk Factors for Disease Maintenance. [Journal]. - [s.l.] : Transbound. Emerg. Dis., 2016. - 63, e165–e177.
140. Laddomada A [et al.] Epidemiology of classical swine fever in Sardinia: A serological survey of wild boar and comparison with African swine fever. [Journal]. - [s.l.] : Vet. Rec, 1994. - 134, 183–187.

141. Laddomada A [et al.] Epidemiology of classical swine fever in Sardinia: A serological survey of wild boar and comparison with African swine fever. [Journal]. - [s.l.] : Vet. Rec, 1994. - 134, 183–187..
142. Laddomada A [et al.] surveillance and control of African Swine Fever in free-ranging pigs in Sardinia. [Journal]. - [s.l.] : Transbound. Emerg. Dis, 2019. - 66, 1114–1119.
143. Leitão A, C. Cartaxeiro e R. Coelho The non-haemadsorbing African swine fever virus isolate ASFV/NH/P68 provides a model for defining the protective anti-virus immune response [Journal]. - [s.l.] : J Gen Virol, 2001. - 82:513–523.
144. Linden A [et al.] African swine fever virus hits north-western Europe. [Journal]. - [s.l.] : Transbound Emerg Dis, 2019. - Vol. 66:54–5. doi: 10.1111/tbed.13047.
145. Lithgow P [et al.] Correlation of cell surface marker expression with African swine fever virus infection. [Journal]. - [s.l.] : Vet Microbiol, 2014. - Vol. 168:413–9. doi: 10.1016/j.vetmic.2013.12.001.
146. Liu Q [et al.] Structure of the African swine fever virus major capsid protein p72 [Journal]. - [s.l.] : Cell research, 2019.
147. Loi F [et al.] Standardized risk analysis approach aimed to evaluate the last African swine fever eradication program performance, in Sardinia. [Journal]. - [s.l.] : Front Vet Sci., 2019. - 6:299. doi: 10.3389/fvets.2019.00299.
148. Loi F [et al.] Standardized risk analysis approach aimed to evaluate the last standardized risk analysis approach aimed to evaluate the last African swine fever eradication program performance in Sardinia. [Journal]. - [s.l.] : Front. Vet. Sci, 2019. - 6, 299.
149. Lokhandwala S, V. Petrovan e L. Popescu Adenovirus-vectored African Swine Fever Virus antigen cocktails are immunogenic but not protective against intranasal challenge with Georgia 2007/1 isolate. [Journal]. - [s.l.] : Vet Microbiol, 2019. - 235:10–20.
150. Lu G, J. Pan e G. Zhang African Swine Fever virus in Asia: Its rapid spread and potential threat to unaffected countries. [Journal]. - [s.l.] : Journal of Infection, 2020. - 80(3), 350–371. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2019.11.011>.
151. Lubisi B. [et al.] Molecular epidemiology of African swine fever in East Africa [Sezione di libro]. - [s.l.] : Archives of Virology, 2005.
152. Lubisi B.A. [et al.] An investigation into the first outbreak of African swine fever in the Republic of Mauritius [Sezione di libro]. - [s.l.] : Transboundary and Emerging Diseases, 2009.
153. Lucchini V [et al.] New phylogenetic perspectives among species of South-east Asian wild pig (*Sus sp.*) based on mtDNA sequences and morphometric data [Atti di convegno]. - [s.l.] : J. Zool., 2005. - Vol. 266, 25–35.
154. Luther N.J. [et al.] Detection of African swine fever virus genomic DNA in a Nigerian red river hog (*Potamochoerus porcus*) [Journal]. - [s.l.] : Veterinary Record, 2007. - pp. 58-59 : Vol. 160.
155. Lyra TM The eradication of African swine fever in Brazil, 1978–1984 [Journal]. - [s.l.] : Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epizoot, 2006. - 25, 93–103.

156. MacLachlan NJ e E.J. Dubovi Fenner's Veterinary Virology [Journal]. - San Diego, CA, USA : Academic Press, 2017. - pp. 175–182.
157. Makadiya N [et al.] S1 domain of the porcine epidemic diarrhea virus spike protein as a vaccine antigen. [Journal]. - [s.l.] : Virol. J., 2016. - 13, 57.
158. Malogolovkin A, G. Burmakina e E.R. Tulman African swine fever virus CD2v and C-type lectin gene loci mediate serological specificity. [Journal]. - [s.l.] : J Gen Virol , 2015. - 96:866–873..
159. Matos AP e Z.G. Carvalho African swine fever virus interaction with microtubules [Journal]. - [s.l.] : Biol Cell, 1993. - 78:229–34. doi: 10.1016/0248-4900(93)90134-Z.
160. Mazur-Panasiuk N, j. Żmudzki e G. Woźniakowski African swine fever virus-persistence in different environmental conditions and the possibility of its indirect transmission [Journal]. - [s.l.] : J Vet Res., 2019. - 63:303–10..
161. Mebus CA African swine fever [Journal]. - [s.l.] : Advances in Virus Research, 1988. - pp. 251-269.
162. Mebus CA e A.H. Dardiri Additional characteristics of disease caused by the African swine fever viruses isolated from Brazil and the Dominican Republic. [Journal]. - [s.l.] : Proc Annu Meet U S Anim Health Assoc, 1979. - 1979:227–39..
163. Meeusen ENT [et al.] Current status of veterinary vaccines [Journal]. - [s.l.] : Clin Microbiol Rev, 2007. - 20: 489-510.
164. Mighell Ellen e Michael.P. Ward African Swine Fever spread across Asia, 2018–2019 [Journal]. - [s.l.] : Transboundary and Emerging Diseases, 2021. - p. 2722-2732 : Vol. 68.
165. Ministero della Salute Dati epidemiologici nazionali e internazionali [Journal]. - 2023. - <https://www.salute.gov.it/portale/pesteSuinaAfricana/dettaglioContenutiPSA.jsp?lingua=italiano&id=5955&area=pesteSuinaAfricana&menu=vuoto>.
166. Ministero della Salute Manuale delle emergenze da Peste Suina Africana in popolazioni di suini selvatici [Rapporto]. - [s.l.] : dell'Ufficio 3 Sanità animale, 2022.
167. Ministero della Salute Manuale operativo nei suini detenuti: Peste Suina Classica, Peste Suina Africana [Rapporto]. - [s.l.] : dell'Ufficio 3 Sanità animale, 2022.
168. Ministero della Salute Piano di sorveglianza ed eradicazione in Italia per il 2023- linee guida operative, [Rapporto]. - [s.l.] : Direzione Generale della Sanità Animale e dei Farmaci Veterinari, 2023.
169. Mona S, E. Randi e M. Tommaseo-Ponzetta evolutionary history of the genus Sus inferred from cytochrome b sequences [Atti di convegno]. - [s.l.] : Mol. Phylogenet. Evol, 2007. - Vol. 45, 757–762.
170. Montgomery R.E. On a form of swine fever occurring in British East Africa (Kenya Colony) [Sezione di libro]. - [s.l.] : Journal of Comparative Pathology, 1921.
171. Montgomery R.E. On a form of swine fever occurring in British East Africa (Kenya Colony) [Journal]. - [s.l.] : J. Comp. Pathol., 1921. - pp. 159-161.

172. Moral M Gomez del [et al.] African swine fever virus infection induces tumor necrosis factor alpha production: implications in pathogenesis. [Journal]. - 1999. - 73:2173–80. doi: 10.1128/JVI.73.3.2173-2180.1999 : Vol. J Virol..
173. Mottet A [et al.] Review: domestic herbivores and food security: current contribution, trends and challenges for a sustainable development. [Journal]. - [s.l.] : Animal, 2018. - 12: s188-s198.
174. Moulton J e L. Coggins Comparison of lesions in acute and chronic African swine fever [Journal]. - [s.l.] : Cornell Vet, 1968. - 58:364–88..
175. Moulton JE Pan IC, Hess WR, DeBoer CJ, Tessler J athologic features of chronic pneumonia in pigs with experimentally induced African swine fever. [Journal]. - [s.l.] : Am J Vet Res, 1957. - 36:27–32..
176. Müller T [et al.] Pseudorabies virus in wild swine: A global perspective. [Journal]. - [s.l.] : Arch. Virol, 2011. - 156, 1691–1705.
177. Munoz-Moreno R [et al.] Host cell targets for African swine fever virus [Journal]. - [s.l.] : Virus Res, 2015. - 209:118–27. doi: 10.1016/j.virusres.2015.05.026.
178. Mur L [et al.] 35-year presence of african swine fever in sardinia: history, evolution and risk factors for disease maintenance. [Journal]. - [s.l.] : Transbound Emerg Dis. , 2014. - 3:113. doi: 10.1111/tbed.12264.
179. Mur L [et al.] Monitoring of African swine fever in the wild boar population of the most recent endemic area of Spain [Journal]. - [s.l.] : Transbound. Emerg. Dis., 2012. - 59, 526–531.
180. MushagalusaI Ciza A., Eric EtterII III e PenrithIV Mary-Louise Review of African swine fever outbreaks history in South Africa: From 1926 to 2018 [Journal]. - Pretoria : Onderstepoort Journal of Veterinary Research, 2021. - Vol. vol.88 n.1 .
181. Neilan JG, L. Zsak e Z. Lu Neutralizing antibodies to African swine fever virus proteins p30, p54, and p72 are not sufficient for antibody-mediated protection [Journal]. - [s.l.] : Virology, 2004. - 319:337–342.
182. Netherton CL [et al.] The genetics of life and death: virus-host interactions underpinning resistance to African swine fever, a viral hemorrhagic disease. [Journal]. - [s.l.] : Front Genet, 2019. - 10:402. doi: 10.3389/fgene.2019.00402.
183. Netherton CL, L.C. Goatley e A.L. Reis Identification and immunogenicity of African swine fever virus antigens. [Journal]. - [s.l.] : Front Immunol, 2019. - 10:1318.
184. Niu D e H.J. Wei Inactivation of porcine endogenous retrovirus in pigs using CRISPR-Cas9. [Journal]. - [s.l.] : Science, 2017. - 357, 1303–1307.
185. Nowak R Walker's mammals of the world, 5th edn Baltimore [Atti di convegno] // MD: The Johns Hopkins University Press. - 1991.
186. Nurmoja I [et al.] Biological characterization of African swine fever virus genotype II strains from north-eastern Estonia in European wild boar [Journal]. - [s.l.] : Transbound Emerg Dis, 2017. - 64:2034–41. doi: 10.1111/tbed.12614.
187. OIE Terrestrial Animal Health Code: General Provisions [Journal]. - Paris : OIE., 2019. - Vol. 1.

188. OIE Self-Declaration of the Recovery of Freedom from African Swine Fever in All Suids by the Czech Republic; [Atti di convegno] // Self-declaration submitted to the OIE on 1 April 2019 by Dr. Zbynek Semerád, Director General State Veterinary Administration,. - Paris, France : Ministry of Agriculture, Czech Republic, OIE Delegate for Czech Republic, 2019.
189. OIE WAHID Office International des Epizooties–World Animal Health Information Database (WAHID) Interface [Journal]. - 2009. - <http://www.oie.int/wahis/public.php?page=home>.
190. Olsevskis E [et al.] African swine fever in Latvian wild boar—A step closer to elimination [Journal]. - [s.l.] : *Transbound. Emerg. Dis.*, 2020. - 67, 2615–2629.
191. Olsevskis E [et al.] African swine fever virus introduction into the EU in 2014: [Journal]. - [s.l.] : *xperience of Latvia. Res. Vet. Sci.*, 2016. - 105, 28–30.
192. Oura CA, P.P. Powell e R.M. Parkhouse African swine fever: a disease characterized by apoptosis [Journal]. - [s.l.] : *J Gen Virol*, 1998. - 79:1427–38. doi: 10.1099/0022-1317-79-6-1427.
193. Owolodun O. [et al.] Molecular characterisation of African swine fever viruses from Nigeria (2003–2006) recovers multiple virus variants and reaffirms CVR epidemiological utility [Journal]. - [s.l.] : *Virus Genes*, 2010. - pp. 361-368 : Vol. 41 (3) .
194. Ozawa Y [et al.] A review of recent unexpected animal disease events in Japan and Korea and the follow-up action taken [Journal]. - [s.l.] : *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epizoot*, 2006. - 25, 125–135.
195. Palgrave CJ, L. Gilmour L, Lowden CS, Lillico SG, M.A., Mellencamp e C.B. Whitelaw Species-specific variation in RELA underlies differences in NF-kappaB activity: a potential role in African swine fever pathogenesis [Journal]. - [s.l.] : *J Virol*, 2011. - 85:6008–14. doi: 10.1128/JVI.00331-11.
196. Pan IC e W.R. Hess Virulence in African swine fever: its measurement and implications. [Journal]. - [s.l.] : *Am J Vet Res*, 1984. - 45:361–6.
197. Panina GF [et al.] Survival of foot and mouth disease virus in sausage meat products (Italian salami) [Journal]. - [s.l.] : *Int. J. Food Microbiol.*, 1989. - pp. 141-148.
198. Pautienius A [et al.] Prevalence and spatiotemporal distribution of African swine fever in Lithuania, 2014–2017 [Journal]. - [s.l.] : *Virol. J*, 2018. - 15, 177.
199. Pearson A B Review of New Zealand's biosecurity surveillance systems [Atti di convegno] // New Zealand: Prime Consulting International Ltd. - 2002. - Vol. pp. 84–95 Waikanae.
200. Pejsak Z. [et al.] Four years of African swine fever in Poland. New insights into epidemiology and prognosis of future disease spread. [Journal]. - [s.l.] : *Pol. J. Vet. Sci*, 2018. - 21, 835–841.
201. Penrith M.-L. History of 'swine fever' in southern Africa [Journal]. - [s.l.] : *J. South Afr. Vet. Assoc.-Tydskrif Van Die Suid-Afrikaanse Veterinere Vereniging*, 2013. - Vol. 84.
202. Penrith M.L., G.R. Thomson e A.D.S. Bastos African swine fever [Sezione di libro]. - Cape Town : *fectious Diseases of Livestock with Special Reference to Southern Africa*., 2004.
203. Penrith M.L., G.R. Thomson e A.D.S. Bastos African swine fever [Sezione di libro]. - Cape Town : *Infectious Diseases of Livestock with Special Reference to Southern Africa*, 2004.

204. Penrith ML [et al.] Epidemiology of African swine fever in Africa today: sylvatic cycle versus socio-economic imperatives. [Journal]. - [s.l.] : Transbound Emerg Dis, 2019. - Vol. 66:672–86. doi: 10.1111/tbed.13117.
205. Petrini S [et al.] Survival of African swine fever virus (ASFV) in various traditional Italian dry-cured meat products [Journal]. - [s.l.] : Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell’Umbria e delle Marche, 2019.
206. Pikalo J [et al.] Pathogenesis of African swine fever in domestic pigs and European wild boar - Lessons learned from recent animal trials. [Journal]. - [s.l.] : Virus Res, 2019. - 271:197614. doi: 10.1016/j.virusres.2019.04.001.
207. Pitts N e T. Whitnall Impact of African Swine Fever on global markets. [Journal]. - [s.l.] : Agricultural Commodities, 2019. - <http://www.agriculture.gov.au/abares/research-topics/agricultural-commodities/sep-2019/african-swine-fever>.
208. Plowright W. African swine fever [Sezione di libro]. - Iowa University Press, Iowa : Infectious Diseases of Wild Mammals, 1981.
209. Plowright W., G.R. Thomson e J.A. Nesor African swine fever [Sezione di libro]. - Oxford University Press, Cape Town : J.A.W. Coetzer, G.R. Thomson, R.C. Tustin (Eds.), Infectious Diseases of Livestock with Special Reference to Southern Africa, 1994.
210. Plowright: W, J. Parker e MA. Pierce African swine fever virus in ticks (*Ornithodoros moubata*, Murray) collected from animal burrows in Tanzania. [Journal]. - [s.l.] : Nature, 1969. - Vol. 221:1070–3. doi: 10.1038/2211071a0.
211. Popescu L. [et al.] Genetically edited pigs lacking CD163 show no resistance following infection with the African swine fever virus isolate, Georgia 2007/1 [Journal]. - [s.l.] : Virology, 2017. - Vol. 501.
212. Pornthummawat A [et al.] Pathological lesions and presence of viral antigens in four surviving pigs in African swine fever outbreak farms in Vietnam. [Journal]. - [s.l.] : J. Vet. Med. Sci., 2021. - 83:1653–1660. doi: 10.1292/jvms.21-0409. .
213. Portugal R, J. Coelho e D. Höper Related strains of African swine fever virus with different virulence: Genome comparison and analysis. [Journal]. - [s.l.] : J Gen Viro, 2015. - 96:408–419..
214. Probst C [et al.] The potential role of scavengers in spreading African swine fever among wild boar [Journal]. - [s.l.] : Sci Rep, 2019. - 9:11450.
215. Ravaomanana J [et al.] First detection of African swine fever virus in *Ornithodoros porcinus* in Madagascar and new insights into tick distribution and taxonomy [Journal]. - [s.l.] : Parasit Vectors, 2010. - 3:115. doi: 10.1186/1756-3305-3-115.
216. Regolamento 17 dicembre 2019 n. 686 REGOLAMENTO DELEGATO (UE) 2020/686 DELLA COMMISSIONE [Rapporto]. - [s.l.] : GAZZETTA UFFICIALE DELLA REPUBBLICA ITALIANA, 2020.
217. Regulation (EU) 2016/429 of the European Parliament and of the Council of 9 March 2016 on Transmissible Animal Diseases and Amending and Repealing Certain Acts in the Area of Animal Health (“Animal Health Law”) [Journal]. - [s.l.] : Official Journal of the European Union., 2022.

218. Reicks DL Effective biosecurity to protect North American studs and clients from emerging infectious disease [Journal]. - [s.l.] : Theriogenology, 2019. - 137, 82–87.
219. Renukaradhya GJ [et al.] Inactivated and subunit vaccines against porcine reproductive and respiratory syndrome: Current status and future direction. [Journal]. - [s.l.] : Vaccine, 2015. - 33, 3065–3072.
220. Revilla Y, D Perez-Nunez e JA Richt African Swine Fever Virus Biology and Vaccine Approaches. [Journal]. - [s.l.] : Adv Virus Res, 2018. - 100:41–74. doi: 10.1016/bs.aivir.2017.10.002.
221. Ribeiro J J Manso e J.A. Azevedo La peste porcine africaine au Portugal [Journal]. - [s.l.] : Bull. Off. Int. Epizoot, 1961. - 55, 88– 108.
222. Rodriguez JM [et al.] African swine fever virus structural protein p54 is essential for the recruitment of envelope precursors to assembly sites. [Journal]. - [s.l.] : J Virol, 2004. - 78:4299–1313. doi: 10.1128/JVI.78.8.4299-4313.2004.
223. Rolesu S [et al.] African Swine Fever in Smallholder Sardinian Farms: Last 10 Years of Network Transmission Reconstruction and Analysis [Journal]. - [s.l.] : Front. Vet. Sci., 2021. - <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.692448>.
224. Rouiller I. [et al.] African swine fever virus is wrapped by the endoplasmic reticulum [Journal]. - [s.l.] : Journal of Virology, 1998. - Vol. 72.
225. Rowlands R. [et al.] African swine fever isolate, Georgia, 2007 [Sezione di libro]. - [s.l.] : Emerging Infectious Diseases, 2008.
226. Ruiz-Gonzalvo F, F. Rodríguez e J.M. Escribano Functional and immunological properties of the baculovirus-expressed hemagglutinin of African swine fever virus [Journal]. - [s.l.] : Virology., 1996. - 218:285–289.
227. Rweyemamu M [et al.] Epidemiological patterns of foot-and-mouth disease worldwide [Atti di convegno]. - [s.l.] : Transbound. Emerg. Dis, 2008. - Vol. 55, 57–72 .
228. Salas María L e Germán Andrés African swine fever virus morphogenesis [Journal]. - [s.l.] : Virus Research, 2013. - Vol. 173.
229. Salguero FJ [et al.] Proinflammatory cytokines induce lymphocyte apoptosis in acute African swine fever infection. [Journal]. - [s.l.] : J Comp Pathol, 2005. - 132:289–302. doi: 10.1016/j.jcpa.2004.11.004.
230. Salguero Francisco J. Comparative Pathology and Pathogenesis of African Swine Fever Infection in Swine [Journal]. - [s.l.] : Veterinary Epidemiology and Economics, 2020. - <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00282>.
231. Sánchez R, A. Oleaga e J.M. Sánchez-Vizcaíno Serological surveillance and direct field searching reaffirm the absence of ornithodoros erraticus ticks role in african swine fever cycle in Sardinia. [Journal]. - [s.l.] : Transbound. Emerg. Dis., 2016. - 64, 1322–1328.
232. Sanchez-Botija C African swine fever. New developments. [Journal]. - [s.l.] : Rev Sci Tech, 1982. - 4:1065–94..

233. Sánchez-Cordón Pedro J [et al.] African Swine Fever: Disease Dynamics in Wild Boar Experimentally Infected with ASFV Isolates Belonging to Genotype I and II [Journal]. - [s.l.] : Viruses, 2019. - doi: 10.3390/v11090852.
234. Sanchez-Cordon PJ [et al.] African swine fever: disease dynamics in wild boar experimentally infected with ASFV isolates belonging to genotype I and II. [Journal]. - [s.l.] : Viruses, 2019. - 1:852. doi: 10.3390/v11090852.
235. Sánchez-Vizcaíno J M, L. Mur e B. Martínez-López African Swine Fever: An Epidemiological Update [Journal]. - [s.l.] : Transboundary and Emerging Diseases, 2012. - <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2011.01293.x> : Vol. 59.
236. Sanchez-Vizcaino JM [et al.] An update on the epidemiology and pathology of African swine fever [Journal]. - [s.l.] : J Comp Pathol, 2015. - 152:9–21. doi: 10.1016/j.jcpa.2014.09.003.
237. Sanchez-Vizcaino JM [et al.] An update on the epidemiology and pathology of African swine fever. [Journal]. - [s.l.] : J Comp Pathol., 2015. - doi: 10.1016/j.jcpa.2014.09.003.
238. Sanchez-Vizcaino JM [et al.] Lymphocyte function and cell-mediated immunity in pigs with experimentally induced African swine fever. [Journal]. - [s.l.] : Am J Vet Res., 1981. - 42:1335–41.
239. Sánchez-Vizcaíno JM, A. Laddomada e M.L. Arias African swine fever virus. [Journal]. - Hoboken : Diseases of Swine, 2019. - 10.1002/9781119350927.ch25.
240. Sanchez-Vizcaino JM, L. Mur e B. Martinez-Lopez African swine fever (ASF): five years around Europe [Journal]. - [s.l.] : Vet. Microbiol, 2013. - pp. 45-50.
241. Sang-Ik OH [et al.] Blood parameters and pathological lesions in pigs experimentally infected with Vietnam's first isolated African swine fever virus [Journal]. - [s.l.] : Front Vet Sci, 2022. - doi: 10.3389/fvets.2022.978398.
242. Satran P From ASF Infection in Wild Boar to Eradication and Free Status Recovery in the Czech Republic. [Journal]. - 2020. - http://web.oie.int/RR-Europe/eng/Regprog/docs/docs/SGE%20ASF12/17_CZ_detailed_situation.pdf.
243. Sauter-Louis C [et al.] African swine fever: Why the situation in Germany is not comparable to that in the Czech Republic or Belgium [Journal]. - [s.l.] : Transbound. Emerg. Dis., 2021.
244. Sauter-Louis Carola [et al.] African Swine Fever in Wild Boar in Europe—A Review [Journal]. - [s.l.] : Viruses, 2021. - <https://doi.org/10.3390/v13091717>.
245. Schulz K [et al.] African swine fever: fast and furious or slow and steady? [Journal]. - [s.l.] : Viruses, 2019. - 11:866. doi: 10.3390/v11090866.
246. Sehl J [et al.] Comparative Pathology of Domestic Pigs and Wild Boar Infected with the Moderately Virulent African Swine Fever Virus Strain "Estonia 2014" [Journal]. - [s.l.] : Pathogens., 2020. - 9:662. doi: 10.3390/pathogens9080662..
247. Seifert HSH Tropical animal health (eds Technical Centre for Agriculture and Rural Cooperation) [Journal]. - [s.l.] : Ede, The Netherlands: Springer, 1996.
248. Shevkoplyas V N [Atti di convegno] // 19th Veterinary Congress Russian Veterinary Association. - Moscow : [s.n.], 2011.

249. Shih T W, C.C. Chou e R.S. Morley Monte Carlo simulation of animal-product violations incurred by air passengers at an international airport in Taiwan. [Atti di convegno]. - [s.l.] : Prev. Vet. Med., 2005. - Vol. 68, 115–122.
250. Sierra MA [et al.] Ultrastructure of the liver in pigs with experimental African swine fever. [Journal]. - [s.l.] : Vet Pathol., 1987. - 24:460–2. doi: 10.1177/030098588702400516.
251. Simeon-Negrin R E e M.T. Frias-Lepoureau 2002Eradication of African swine fever in Cuba (1971 and 1980). [Journal]. - Ames, IA: Iowa State Press : In Trends in emerging viral infections of swine, 2002. - pp. 125–131.
252. Simoes M [et al.] African swine fever virus replication events and cell nucleus: new insights and perspectives. [Journal]. - [s.l.] : Virus Res, 2019. - 270:197667. doi: 10.1016/j.virusres.2019.197667.
253. Simões M. [et al.] Eventi di replicazione del virus della peste suina africana e nucleo cellulare: nuove intuizioni e prospettive [Journal]. - [s.l.] : Virus Res, 2019. - Vol. 270.
254. Simões M., C. Martins e F. Ferreira Host DNA damage response facilitates African swine fever virus infection [Journal]. - [s.l.] : Vet. Microbiol, 2013. - Vol. 165.
255. Smietanka K [et al.] African Swine Fever Epidemic, Poland, 2014–2015. [Journal]. - [s.l.] : Emerg. Infect. Dis., 2016. - 22, 1201–1207.
256. Smither SJ [et al.] Experimental respiratory Marburg virus hemorrhagic fever infection in the common marmoset (*Callithrix jacchus*) [Journal]. - [s.l.] : Int J Exp Pathol., 2013. - 94:156–68. doi: 10.1111/iepathol.12018.
257. Sun E [et al.] Emergence and prevalence of naturally occurring lower virulent African swine fever viruses in domestic pigs in China in 2020. [Journal]. - [s.l.] : Sci China Life Sci., 2021. - 64(5):752–765.
258. Sun E [et al.] Genotype I African swine fever viruses emerged in domestic pigs in China and caused chronic infection [Journal]. - [s.l.] : Emerging Microbes & Infections, 2021. - <https://doi.org/10.1080/22221751.2021.1999779>.
259. Sun E [et al.] emergence and prevalence of naturally occurring lower virulent African swine fever viruses in domestic pigs in China in 2020. [Journal]. - [s.l.] : Sci China Life Sci., 2021. - 64(5):752–765.
260. Thomson G.R. The epidemiology of African swine fever: the role of free living hosts in Africa [Sezione di libro]. - [s.l.] : Onderstepoort Journal of Veterinary Research, 1985.
261. Thomson GR The epidemiology of African swine fever: the role of free-living hosts in Africa. [Journal]. - [s.l.] : Onderstepoort J Vet Res, 1985. - 52:201–9..
262. Torresi C [et al.] The evolution of African swine fever virus in Sardinia (1978–2014) as revealed by whole-genome sequencing and comparative analysis [Journal]. - [s.l.] : Transbound. Emerg. Dis., 2020.
263. Urbanoa A C e F. Ferreira African swine fever control and prevention: an update on vaccine [Journal]. - [s.l.] : Emerging Microbes & Infections, 2022. - Vol. 11.

264. USDA (United States Department of Agriculture) Importing regulations and policies. [Journal]. - 2009. - http://www.usda.gov/wps/portal/!ut/p/_s.7_0_A/7_0_1OB?navid=IMPORTING_GOODS&parentnav=MARKETING_TRADE&navtype=RT.
265. Vaclavek P ASF in the Czech Republic: Management Experience and Lessons Learnt. [Journal]. - 2020. - http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/reu/europe/documents/events2019/ASF_reg/06.pdf.
266. Velazquez-Salinas Lauro, N. Gisselle. Medina e Elizabeth. Ramirez-Medina Pathology of African Swine Fever in Wild Boar Carcasses Naturally Infected with German Virus Variants [Journal]. - [s.l.] : Pathogens., 2022. - oi: 10.3390/pathogens11111386.
267. Vlasov N Expert meeting on African swine fever. [Journal]. - Berlin : [s.n.], 2011.
268. Vogt W Researchers turn to proven process for ASF vaccine development [Journal]. - [s.l.] : FarmProgress , 2021.
269. Wade A. [et al.] enetic characterization of African swine fever virus in Cameroon, 2010-2018 [Journal]. - [s.l.] : J. Microbiol, 2019. - Vol. 57.
270. Wang N [et al.] Architecture of African Swine Fever Virus and Implications for Viral Assembly [Journal]. - [s.l.] : Science, 2019. - 366:640–4. doi: 10.1126/science.aaz1439.
271. Wang X [et al.] nhibition of cGAS-STING-TBK1 signaling pathway by DP96R of ASFV China 2018/1. [Journal]. - [s.l.] : Biochem Biophys Res Commun, 2018. - 506:437–43. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.10.103.
272. Wang Yue [et al.] Structure of African Swine Fever Virus and Associated Molecular Mechanisms Underlying Infection and Immunosuppression: A Review [Journal]. - [s.l.] : Frontiers in Immunology, 2021.
273. Wang Z [et al.] Immune Escape Mechanism and Vaccine Research Progress of African Swine Fever Virus [Journal]. - [s.l.] : Vaccines, 2022. - 10, 344..
274. Wilkinson PJ [et al.] The distribution of African swine fever virus isolated from *Ornithodoros moubata* in Zambia [Journal]. - [s.l.] : Epidemiol Infect., 1988. - Vol. 101:547–64. doi: 10.1017/S0950268800029423.
275. Willett W, J. Rockström e B. Loken Food in the Anthropocene: the EAT–Lancet Commission on healthy diets from sustainable food systems. [Journal]. - [s.l.] : Lancet, 2019. - 393: 447-492.
276. Wooldridge M [et al.] Quantitative risk assessment case study: smuggled meats as disease vectors [Journal]. - [s.l.] : Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epizoot, 2006. - 25, 105–117.
277. World Health Organization Early detection, assessment and response to acute public health events: Implementation of Early Warning and Response with a focus on Event-Based Surveillance [Rapporto]. - 2014.
278. World Organization for Animal Health Terrestrial Animal Health Code 2009 [Journal]. - Paris : World Organization for Animal Health,, 2009. - Chapter 15.1..
279. Xian Y e C. Xiao The Structure of ASFV Advances the Fight against the Disease [Journal]. - [s.l.] : Trends in Biochemical Sciences, 2020. - 276-278 : Vol. 45.

280. Xiao C, M.G. Fischer e D.M. Bolotaulo Cryo-EM reconstruction of the Cafeteria roenbergensis virus capsid suggests novel assembly pathway for giant viruses [Journal]. - [s.l.] : Scientific reports,, 2017.
281. Yu Z [et al.] Tick-borne pathogens and the vector potential of ticks in China [Journal]. - [s.l.] : Parasite Vectors, 2015. - 8(1), 24.
282. Yuan Hongming [et al.] Current Status of Genetically Modified Pigs That Are Resistant to Virus Infection [Journal]. - [s.l.] : Viruses , 2022. - 14(2), 417.
283. Zani L. [et al.] Deletion at the 5'-end of Estonian ASFV strains associated with an attenuated phenotype [Journal]. - [s.l.] : Sci. Rep, 2018. - Vol. 8.
284. Zhao D [et al.] Replication and virulence in pigs of the first African swine fever virus isolated in China. [Journal]. - [s.l.] : Emerging microbes , 2019. - 8(1):438–447.
285. Zheng Xiaojie, Nie Shengming e Fenga Wen-Hai Regulation of antiviral immune response by African swine fever virus (ASFV) [Journal]. - [s.l.] : Virol Sin., 2022. - Vol. 37.
286. Zhu Y. [et al.] The interplay between pattern recognition receptors and autophagy in inflammation [Journal]. - [s.l.] : Adv. Exp. Med. Biol, 2019.
287. Zsak L, D. Onisk e C.L. Afonso Virulent African Swine Fever Virus Isolates Are Neutralized by Swine Immune Serum and by Monoclonal Antibodies Recognizing a 72-kDa Viral Protein. [Journal]. - [s.l.] : Virology, 1993. - 196:596–602.