



UNIVERSITÀ DI PARMA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICO-VETERINARIE

Corso di Laurea Magistrale a ciclo unico in Medicina Veterinaria

PESTE SUINA AFRICANA: EVOLUZIONE DELLA MALATTIA IN EUROPA

AFRICAN SWINE FEVER: EVOLUTION OF THE DISEASE IN EUROPE

Relatore

Chiar.mo Prof. Sandro CAVIRANI

Laureanda

Laura CASTRIGNANO'

ANNO ACCADEMICO 2022/2023

SOMMARIO

ABSTRACT.....	6
INTRODUZIONE.....	8
CAPITOLO I: CARATTERISTICHE DEL VIRUS E PATOGENESI.....	11
ASFV: ASPETTI VIROLOGICI	11
EZIOLOGIA	11
STRUTTURA GENOMICA E MORFOLOGIA.....	11
MECCANISMO DI INFEZIONE	13
MORFOGENESI.....	14
CELLULE TARGET	16
GENOTIPIZZAZIONE.....	17
MECCANISMI PATOGENETICI	21
TRASMISSIONE	21
CICLI EPIDEMIOLOGICI.....	22
IL VETTORE BIOLOGICO	23
CICLO SELVATICO	24
RISPOSTA IMMUNIARIA	29
CAPITOLO II: SINTOMATOLOGIA E LESIONI ANATOMOPATOLOGICHE.....	35
SUINI DOMESTICI	35
FORMA PERACUTA.....	36
FORMA ACUTA.....	36
FORMA SUBACUTA	38
FORMA CRONICA	40
PATOGENESI DELLA DEPLEZIONE LINFOIDE.....	41
PATOGENESI DELLE ALTERAZIONI VASCOLARI.....	42
CINGHIALI EURO ASIATICI.....	44
FACOCERI E POTAMOCERI	45
COMPARAZIONE CON ALTRI PATOGENI	46
PESTE SUINA CLASSICA (CSF)	47
PORCINE REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY SYNDROME (PRRS)	48
PORCINE DERMATITIS AND NEPHROPATHY SYNDROME (PDNS)	48
MAL ROSSINO (ERYSIPELOTHRIX RHUSIOPATHIAE).....	49

MALATTIA DI AUJESZKY (PRV)	50
SALMONELLOSI	50
PERSISTENZA E RESISTENZA.....	51
SUINI DOMESTICI	51
CINGHIALI SELVATICI.....	55
DIAGNOSI.....	55
SUINI DOMESTICI	55
IDENTIFICAZIONE DELL'AGENTE.....	58
ISOLAMENTO VIRALE	58
TEST SIEROLOGICI	61
PROGRESSI IN CAMPO DIAGNOSTICO	63
CINGHIALI SELVATICI	64
CAPITOLO III: SITUAZIONE EPIDEMIOLOGICA PASSATO VS PRESENTE	66
PRIMA ONDATA EUROPEA.....	67
SECONDA ONDATA EUROPEA	70
GEORGIA.....	71
FEDERAZIONE RUSSA	72
UCRAINA	74
BIELORUSSIA.....	76
LITUANIA	77
LETTONIA.....	78
ESTONIA	79
UNGHERIA	81
REPUBBLICA CECA.....	81
ROMANIA	82
BULGARIA.....	83
MOLDAVIA.....	86
REPUBBLICA SLOVACCA	86
SERBIA	86
BELGIO.....	86
POLONIA.....	91
GERMANIA	96
NEL MONDO	97
CAPITOLO IV: ITALIA	99

NORD ITALIA: PIEMONTE-LIGURIA-LOMBARDIA.....	100
CENTRO ITALIA: LAZIO	102
SUD ITALIA: CALABRIA.....	104
CENTRO-SUD ITALIA: CAMPANIA	106
SARDEGNA	107
LA GESTIONE DEI FOCOLAI IN ITALIA.....	110
CAPITOLO V: PROSPETTIVE PER IL CONTENIMENTO DELLA LA PSA.....	114
VACCINAZIONE.....	114
 CONSIDERAZIONI GENERALI E LIMITI	115
 PROGRESSI NELLA RICERCA DEI VACCINI.....	119
 MISURE DI CONTROLLO E PREVENZIONE: BIOSICUREZZA	127
CONCLUSIONE	133
BIBLIOGRAFIA.....	134

ABSTRACT

African Swine Fever (ASF) is a viral disease caused by a DNA virus from the Asfviridae family, ASFV.

It affects pigs and wild boars, proving highly contagious and often lethal, but it does not transmit to humans. In recent years, the pathology has emerged as a significant threat to the global swine industry, with a considerable impact on the economy and food security. This thesis investigates the spread of ASF in Europe, focusing on the complex interaction between the virus, host populations, and various ecological factors that facilitate its dissemination. Through a multidisciplinary approach encompassing epidemiology, molecular biology, and socio-economic considerations, this thesis aims to provide a comprehensive understanding of the disease's evolution in the European context.

The first chapter provides an overview of the virus from a genomic and morphological perspective, serving as a starting point to clarify the antigenic diversity that allows differentiation of ASFV into 24 genotypes, identifying genotype II as the main source of infection in European territory. It includes an analysis of the pathogenic mechanisms the virus manifests in the host to induce disease, describing current knowledge regarding the host's triggered immune response and the viral mechanisms enabling ASFV to evade it. Special attention is given to the disease transmission methods, involving pig and wild boar hosts, vectors, and the virus's resistance and persistence in the environment.

The second chapter begins with an assessment of the pathogenesis of symptoms, resulting in different clinical forms induced by ASFV: asymptomatic, peracute, acute, subacute, and chronic. It is followed by an evaluation of anatomopathological findings in infected subjects and a comparison of the identified lesions with those common to other diseases, allowing a differential diagnosis. These insights provide understanding tools for the diagnosis of African Swine Fever, detectable through direct and/or indirect research methods, without overlooking the latest developments in diagnostic techniques.

The third chapter offers a comprehensive overview of the historical context, tracing the introduction and subsequent spread of ASF from Africa to Europe, following its waves, with references to the current global situation.

The fourth chapter is dedicated to describing the current situation in Italy, focusing on the management of detected outbreaks and the regulatory plans governing their handling, assessing encountered challenges due to various factors, including the characteristics of the territory and fauna, as well as the socio-economic aspects of affected areas.

The fifth chapter revolves around the overall evaluation of the effectiveness of existing control and management strategies, considering both biosecurity measures and the results obtained in the search for new safe and effective vaccines. It focuses on encouraging results that could lead to the development of new candidates.

Future directions are provided regarding disease management and animal welfare.

INTRODUZIONE

La Peste Suina Africana (PSA) è una malattia virale altamente contagiosa e spesso letale che colpisce suini domestici e cinghiali selvatici. La sua diffusione in Europa negli ultimi anni ha avuto un impatto significativo sull'industria suinicola e ha sollevato preoccupazioni per la sicurezza alimentare e la salute pubblica.

La PSA rappresenta una minaccia crescente per l'Europa, con nuovi focolai che si verificano regolarmente in diverse zone. La sua natura altamente contagiosa e la mancanza di un vaccino efficace rendono la gestione della malattia una sfida complessa.

Questa tesi si propone di analizzare la diffusione della PSA in Europa negli ultimi anni, con particolare attenzione all'epidemiologia, al ruolo dei cinghiali selvatici, allo sviluppo di vaccini e alle strategie di biosicurezza messe in atto per fronteggiare questa emergenza.

La prima identificazione di ASFV, il virus responsabile delle Peste Suina Africana, risale al 1921 in Kenya. Da allora il virus si è diffuso in diverse zone del continente, causando focolai epidemici in molti paesi.

La diffusione della PSA dall'Africa agli altri continenti è stata favorita da diversi fattori, tra cui la pratica di commercio di animali vivi, la presenza di specie suscettibili, quali cinghiali selvatici e suini domestici, la presenza di vettori artropodi in grado di trasmettere la malattia e la mancanza di misure di biosicurezza che ne ostacolassero la trasmissione.

Le rotte di diffusione della PSA in Europa possono essere suddivise in due periodi, definibili come prima e seconda ondata europea.

ASFV compare per la prima volta in Europa nel 1957, precisamente in Portogallo, attraverso scarti alimentari contaminati provenienti da un aeroplano partito dall'Africa. Il virus si è poi diffuso in Spagna, dove è stato eradicato solo nel 1995.

La seconda ondata ha inizio nel 2007 con il riscontro di un primo caso di PSA in Georgia, probabilmente dovuto al commercio di suini vivi. Il virus si è diffuso da qui in diversi paesi dell'Europa orientale, tra cui Russia, Ucraina, Bielorussia e Polonia.

Nel 2014 sono stati segnalati i primi casi in Repubblica Ceca, Romania, Ungheria. Nel 2019 in Bulgaria, Serbia, Slovacchia.

Nel 2020 la PSA viene identificata per la prima volta in Germania nei cinghiali selvatici.

Si presume che l'introduzione nel paese sia avvenuta tramite il trasporto di carne suina contaminata. Seguono notifiche della malattia in Belgio e Ucraina.

Nel 2022 sono segnalati i primi casi di PSA nell'Italia peninsulare. In Sardegna la PSA è invece una malattia endemica dal 1978.

La diffusione della malattia ha avuto un impatto significativo sull'industria suinicola africana ed europea, comportando perdite economiche per gli allevatori, restrizioni commerciali con ricadute negative su tutto il settore del commercio, oltre ad un grave rischio per la sicurezza alimentare, senza considerare le perdite incommensurabili di fauna locale e soggetti in allevamento.

L'analisi epidemiologica delle rotte di diffusione della malattia consente, tramite l'elaborazione dei dati preesistenti e raccolti negli ultimi anni, di creare dei modelli che possano comprendere la situazione attuale per migliorare le strategie di controllo della diffusione del virus, con l'obiettivo di giungere all'eradicazione della PSA in Europa nei prossimi anni.

L'indagine epidemiologica ha consentito di individuare i fattori di rischio per la diffusione della malattia. Tra di essi rivestono un ruolo di spicco i cinghiali selvatici presenti nel territorio europeo, fonte costante di trasmissione virale, e le attività antropiche, responsabili della diffusione del virus a lunga distanza.

Non si è ancora giunti ad una comprensione totale della malattia. Le conoscenze riguardo alla biologia e alla patologia virale sono purtroppo incomplete, fattore che ostacola la costruzione di un vaccino in grado di proteggere dalla PSA.

Allo stesso tempo risulta opportuno implementare lo studio dei cicli di trasmissione della PSA, con particolare attenzione al nuovo ciclo habitat-cinghiale descritto in Europa.

L'adozione di pratiche di biosicurezza rigorose è fondamentale per proteggere gli allevamenti di suini dalla PSA. Collaborando con le autorità veterinarie e implementando queste misure gli allevatori possono contribuire in modo significativo e attivo al controllo della PSA in Europa.

Risulta necessario migliorare anche le misure di biosicurezza nei confronti della popolazione di cinghiali selvatici. Emerge l'esigenza di un miglioramento della sorveglianza attiva, ma soprattutto della sorveglianza passiva, con massima attenzione sulla gestione delle carcasse

infette presenti nel territorio. Occorre inoltre rimodulare le altre misure previste dal piano, tra cui la caccia, la costruzione di recinzioni, la sensibilizzazione e formazione dei soggetti interessati.

La collaborazione tra diverse parti interessate, tra cui autorità competenti, cacciatori, allevatori e cittadini, è fondamentale per il successo di queste misure.

CAPITOLO I: CARATTERISTICHE DEL VIRUS E PATOGENESI

ASFV: ASPETTI VIROLOGICI

EZIOLOGIA

La Peste Suina Africana (PSA) è una malattia infettiva sostenuta da ASFV, virus appartenente alla famiglia *Asfviridae*, genere *Asfivirus*.

I virus *Asfviridae* sono annoverati nella superfamiglia *NCLDV*, o *Nucleocytoviricota*, virus giganti nucleocitoplasmatici a DNA. (Karki et al., 2021)

ASFV è l'unico DNA Arbovirus noto, trasmesso da zecche molli appartenenti al genere *Ornithodoros*, (Gaudreault et al., 2020)

Per lungo tempo ASFV è stato considerato l'unico esponente della famiglia *Asfviridae*.

Questo dato è stato smentito da recenti studi che hanno dimostrato come la famiglia comprenda anche altri membri, abitanti di ecosistemi terrestri e oceanici. (Karki et al., 2021)

STRUTTURA GENOMICA E MORFOLOGIA

ASFV è un virus gigante a DNA a doppio filamento, con struttura icosaedrica e un diametro approssimativamente tra i 260 e i 300 nm. (Hakobyan et al., 2018; Revilla et al., 2018)

La sua struttura comprende quattro strati concentrici propri del virus, più uno strato esterno che il virus acquisisce nella cellula ospite.

Dall'esterno verso l'interno ritroviamo: un involucro esterno, un capsid, una membrana interna, un capsid interno (core shell) e un nucleo. (S. Yang et al., 2023)

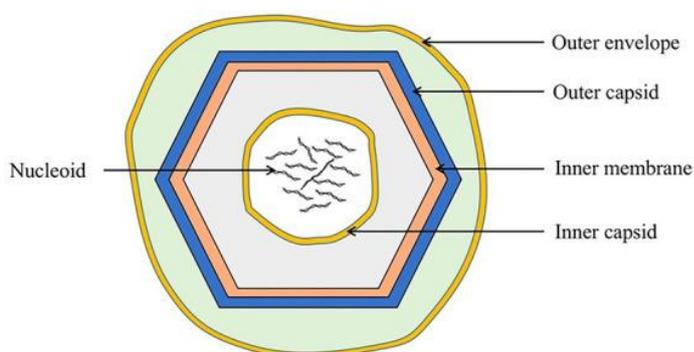


Figura 1: schema della struttura di ASFV. ASFV è composto da un involucro esterno, un capsid esterno, una membrana interna, un capsid interno (core shell) e un nucleo. (Yang et al.)

L'involucro esterno è lo strato più lontano dal nucleo, è acquisito dal virus durante il processo di gemmazione dalla cellula ospite. Sono state individuate alcune frazioni proteiche di pEP402R (CDsv) proprio in questo strato, esse costituiscono l'unico marker molecolare dell'involucro.

La proteina p12 media l'assorbimento del virus da parte della cellula ospite, è una proteina di membrana che lega specifici recettori sulla membrana della cellula ospite, favorendo l'ingresso del virus. Alcuni studi hanno dimostrato la presenza di questa proteina anche nell'involucro interno. (Alejo et al., 2018; Angulo et al., 1993) L'involucro esterno può essere coinvolto nel processo di adesione ed endocitosi virale nella cellula ospite, il virus penetra la cellula tramite endocitosi mediata da clatrina e macropinosi. (Galindo et al., 2015; Mercer et al., 2010; K. Zhang et al., 2021)

Il capsid esterno ha una struttura icosaedrica e un diametro che misura approssimativamente 250 nm. È formato da 2760 capsomeri pseudo-esamERICI e 12 capsomeri pentamerici.

La proteina pB438L forma i vertici del capsid, oltre ad essa sono state individuate anche le proteine p72, pB438L e pE120R. (Alejo et al., 2018)

Tra i costituenti del capsid di maggiore spicco evidenziamo la proteina p72, che costituisce il 31-33% della massa totale del virione. (Andrés et al., 2020) È una proteina fondamentale nell'induzione di una risposta anticorpale a seguito dell'infezione virale. Grazie alla sua immunogenicità e conservazione è usata come target di ricerca anticorpale per le infezioni da ASFV. (Caixia et al., 2022; Geng et al., 2022) Il capsid esterno è adiacente alla membrana dell'involucro esterno, con funzione di protezione del virus da nucleasi o altri fattori fisici o chimici provenienti dall'ambiente. (S. Yang et al., 2023)

La membrana interna racchiude un capsid icosaedrico che avvolge il core shell e il nucleotide. (S. Yang et al., 2023) È una membrana a doppio strato lipidico spessa 70 Å. (Revilla et al., 2018)

Tra i suoi costituenti rientrano varie proteine che svolgono ruoli differenti.

pE183R è una proteina chiave coinvolta nel processo di formazione della membrana interna. Secondo studi recenti p17 e pE183L sono coinvolte soprattutto nell'assemblaggio del capsid e ne garantiscono la morfologia icosaedrica, mentre p12, pE248R e pE199L sono coinvolte nell'ingresso del virus nella cellula ospite. pE248R e pE199L sembrano prendere parte al meccanismo di integrazione del virus. Alcuni studi suggeriscono anche la presenza della proteina p22 in questo strato. (Alejo et al., 2018)

Il **core shell** (o capsid interno) è il quarto strato virale, con un diametro di 180 nm.

È necessaria l'azione di una proteasi virale, pS273R per generare questo strato a partire da due precursori proteici, pp220 e pp62. Da pp220 si formeranno P150, p37, p34, p14 e p5; mentre da pp62 si formeranno p35, p15, e p8. (Alejo et al., 2018; Revilla et al., 2018)

Il corretto assemblamento del core shell dipende da quello del capsid esterno e della membrana interna. Il core shell serve a delimitare e proteggere il genoma virale dalle nucleasi della cellula ospite e dai sensori dsDNA, inibendo così la risposta immunitaria innata durante l'infezione nella sua fase iniziale. (Andrés et al., 2020)

La componente più interna del virus è il **nucleoide**, o genoma virale.

Il genoma è rappresentato da una molecola di DNA a doppio filamento con una lunghezza di 170-190 kb (Cackett et al., 2020). La ripetizione o la perdita di alcune delle sequenze virali è uno dei fattori che differenzia le varianti del virus. (Shimmon et al., 2021)

All'interno del genoma sono state individuate due importanti proteine leganti il DNA, p10 e pA104R. (Alejo et al., 2018)

Il genoma codifica per 150-170 open reading frames e 150-165 proteine virali, essenziali per la replicazione virale. Sebbene almeno 54 di queste proteine risultino essere strutturali, è stato evidenziato un loro ruolo, assieme alle proteine non strutturali, nella modulazione o regolazione dei meccanismi di evasione del sistema immunitario dell'ospite. (Njau et al., 2021)

MECCANISMO DI INFEZIONE

Il meccanismo di infezione di ASFV non è ancora ben conosciuto, ciò rende lo sviluppo di un vaccino efficace più complesso. Lo studio delle proteine strutturali e funzionali è essenziale per lo sviluppo di farmaci antivirali e vaccini. (S. Yang et al., 2023)

Affinchè ASFV possa infettare la cellula ospite è necessario che si verifichino sei eventi: adsorbimento, penetrazione, perdita del rivestimento esterno, biosintesi, packaging ed espulsione.

ASFV è internalizzato entro 30 mip (minuti post infezione) a seguito del suo legame con i recettori sulla membrana della cellula ospite o grazie ad un processo di macropinosi.

Dopo l'endocitosi di ASFV il genoma è veicolato nel citosol della cellula ospite, dove inizia la trascrizione virale. Ritroviamo il virione all'interno di endosomi precoci entro 1-30 mip, successivamente è trasportato in endosomi tardivi tra i 30 e i 90 mpi, dove avviene il rilascio del genoma. (Y. Wang et al., 2021)

L'espressione genica avviene in tre momenti, seguendo una strategia che rispetta un piano temporale: fase precoce (IEG, geni immediati precoci), intermedia e tardiva. (L. K. Dixon et al., 2013) L'espressione precoce avviene in 4-6 ore post infezione (hpi) e prevede la produzione di proteine che codificano per la replicazione, seguita dalla replicazione del genoma virale in 6-8 ore. La replicazione del genoma avviene dapprima nel nucleo, poi nel citoplasma.

Dopo la replicazione sono espressi i geni intermedi e tardivi che codificano per proteine strutturali, tra le 8-16 hpi; le proteine sono poi incorporate nel virus.

Tra le 16 e le 24 ore le particelle virali sono assemblate nelle "*viral factories*".

Dopo 24 hpi le particelle virali ben assemblate sono pronte per essere rilasciate al di fuori della cellula ospite. (Gaudreault et al., 2020)

MORFOGENESI

Il processo di assemblamento dei virus avviene in aree specializzate del citoplasma della cellula ospite, le *viral factories*, localizzate in prossimità del nucleo cellulare e del centrosoma (MTOC - MicroTubule Organizing Center). Queste aree sono circondate dalle membrane del reticolo endoplasmatico e ancorate alla vimentina, componente del citoscheletro. Assomigliano ad aggregati, aggregati di proteine posti in vicinanza del MTOC (Heath et al., 2001).

Durante il processo di morfogenesi le *viral factories* subiscono un aumento di volume, occupando sempre più spazio all'interno del citoplasma. (Salas & Andrés, 2013)

Il primo evento che si verifica è un accumulo di materiale all'interno della *factory*, che appare come una piccola struttura curva e aperta, e che costituisce il materiale precursore dell'involucro interno della nuova particella virale. Le prove immunocitometriche dimostrano che i precursori della membrana virale derivano dalle cisterne RE, che sono inglobate nella *factory* e modificate con meccanismi non ancora conosciuti (Salas & Andrés, 2013)

L'involucro interno del virus maturo consiste in un singolo strato lipidico, si ipotizza che esso derivi da modifiche operate dal virus sui frammenti che costituiscono le membrane del RE, o dalla perdita di una delle due membrane a seguito del presunto ripiegamento delle cisterne. (Salas & Andrés, 2013)

Segue la formazione del capsido. La microscopia elettronica ha dimostrato che il capsido è uno strato formato da subunità disposte regolarmente fino a creare una forma esagonale. (JoséL. Carrascosa et al., 1984) Esso viene assemblato a partire dalla faccia convessa delle membrane

virali (Andrés et al., 1997) attraverso un processo ATP e calcio-dipendente (Cobbold et al., 2000).

L'assemblaggio del capsido dipende dalla proteina p72, uno dei suoi maggiori costituenti, ma anche dalla proteina non strutturale pB602L, che funge da chaperone per il ripiegamento di p72 (Cobbold et al., 2001) , e dalla proteina pB438L, presente in quantità minore e probabilmente coinvolta nella formazione dei vertici del capsido. (Epifano et al., 2006)

Contemporaneamente alla morfogenesi del capsido si assiste alla formazione del core shell, che avviene al di sotto della faccia concava dell'involucro virale. Questo dominio sembra essere costituito da due file regolari di subunità globulari di 10nm separate da un sottile strato denso di elettroni. I maggiori costituenti del core shell sono i prodotti della proteolisi messa in atto dai due precursori pp220 e pp62, ma la presenza della proteasi pS273R in questo dominio e la distribuzione subcellulare delle poliproteine e dei loro prodotti indicano che il processo di formazione del core shell sia accoppiato a quello di assemblamento del nucleo. (Andrés et al., 2002) I dati disponibili dimostrano che le poliproteine pp220 e pp62 interagiscono tra di loro per formare il core shell al di sotto dell'involucro lipidico interno.

La formazione del nucleotide è l'ultimo passaggio del processo di morfogenesi. Sono state avanzate due ipotesi riguardo alla modalità con la quale avviene.

Secondo la prima ipotesi dei complessi di nucleoproteine elettrodense, chiamati pronucleoidi, sono preassemblati all'interno delle *viral factories*, e fissati alle membrane in prossimità di particelle "vuote", per poi essere impacchettati nel capsido. (Brookes et al., 1996; Salas & Andrés, 2013) Questa ipotesi non è stata confermata da altri studi.

La seconda ipotesi suggerisce che il DNA virale sia prima impacchettato nel capsido assieme alle nucleoproteine, poi condensato all'interno delle particelle virali, fino a formare il virione osservato all'interno delle *factories*. Il meccanismo non risulta essere pienamente efficiente poichè alcune particelle virali vuote possono essere riscontrate nel citoplasma cellulare, già pronte ad essere rilasciate per gemmazione. (Salas & Andrés, 2013)

Terminato il processo di morfogenesi, le particelle ASFV fuoriescono dalla membrana cellulare della cellula ospite mediante un processo di gemmazione, avvolte da un ulteriore involucro che proviene dalla stessa membrana lipidica che attraversano. (Breese & DeBoer, 1966)

Il processo è consentito da un meccanismo di trasporto intracellulare che media lo spostamento del virione dalla *viral factory* alla superficie cellulare. L'azione è mediata dai microtubuli, (de Matos & Carvalho, 1993) il cui motore è il sistema delle chinesine (Jouvenet et al., 2004) e dalla proteina del capsido pE120R. (Andrés et al., 2001) Il movimento direzionale consentito dai microtubuli è mediato da un motore proteico che idrolizza ATP per indurre i cambi conformazionali necessari a veicolare le particelle virali attraverso i microtubuli.

Lo spostamento di materiale cellulare verso il centro di organizzazione dei microtubuli (MTOC), chiamato trasporto retrogrado, richiede l'intervento di dineine, che fungono da proteine motrici. L'azione delle dineine è consentita dall'associazione con la dinactina, un complesso eterooligomero formato da nove diversi polipeptidi. (Jouvenet et al., 2004)

A seguito del raggiungimento della membrana cellulare si ha il rilascio dei virioni maturi in forma già infettiva; essi risultano essere strutturalmente e antigenicamente differenti rispetto alle forme virali presenti in ambiente extracellulare. Ciò ha implicazioni importanti dal punto di vista della risposta immunitaria da parte dell'ospite infettato. (Salas & Andrés, 2013)

CELLULE TARGET

Nella specie suina ASFV replica preferibilmente nelle cellule della linea dei monociti/macrofagi (Gómez-Villamandos et al., 2013). Il virus può replicare anche in altre tipologie cellulari, tra cui gli epatociti, le cellule dell'epitelio tubulare renale, i neutrofili e le cellule endoteliali. (Carrasco et al., 1996; Gómez-Villamandos, Hervás, Mendéz, et al., 1995)

Studi recenti hanno dimostrato che ASFV è in grado di penetrare in un'ampia gamma di linee cellulari di specie differenti in vitro, ma nella maggior parte di queste cellule il virus non è in grado di innescare un'infezione efficiente. (Gao et al., 2022)

Il ceppo virulento ASFV BA71 fu tra i primi ad essere studiati in vitro, capace di replicare nelle Cellule Vero (BA71V), provenienti da reni di scimmia verde africana. Queste cellule sono state utilizzate come modello di studio in vitro dell'infezione da ASFV e degli studi di replicazione virale. (Enjuanes et al., 1976)

È stato dimostrato che in realtà l'adattamento alle cellule utilizzate nelle colture in vitro possa causare modifiche genetiche al virus, tra cui l'attenuazione della sua virulenza o una diminuita fitness nelle colture macrofagiche suine, come è successo per BA71V e con altri ceppi che si sono pian piano adattati (Rodríguez et al., 2015).

GENOTIPIZZAZIONE

ASFV è un virus gigante a DNA e presenta un grado di mutazione molto basso, ciononostante è possibile riscontrare delle importanti variazioni da un punto di vista genetico e antigenico all'interno della specie.

Come riportato nella review di Qu H et al., è possibile classificare ASFV in 24 genotipi sulla base del gene B646L, e in 8 sierotipi sulla base della metodica di inibizione dell'emoadsorbimento mediato da Ac. (Qu et al., 2022)

La genotipizzazione è uno strumento fondamentale per ricostruire la provenienza dei virus isolati ma anche per indagare la modalità di trasmissione di ASFV a livello mondiale.

Il genoma virale è di 170-190 kb, suddiviso in una regione variabile di sinistra (LVR, 38-48 kb), una regione fissa centrale (regione C, 125 kb) e una regione variabile di destra (RVR, 13-22kb). (Cackett et al., 2020)

I differenti ceppi possono presentare differenze rilevanti in queste posizioni, ad esempio variazioni nelle famiglie multigene in LVR, nella regione variabile centrale (CVR) della regione C, e nei geni EP402R (che consentono l'espressione della proteina CD2v).

La classificazione in 24 genotipi di ASFV è basata sull'analisi del dominio C terminale del gene B646L, che codifica per la proteina p72.

La suddivisione in 8 sierogruppi (SG) è invece stabilita sulla base del raggruppamento filogenetico per la proteina CD2v, codificata dal gene EP402R.

Entrambe le classificazioni consentono una tipizzazione rapida e semplice delle varianti di ASFV e costituiscono il primo approccio per identificare l'origine del virus una volta comparso in nuovi territori.

Anche l'analisi di altre sequenze virali, come di CVR e del gene E183L, aiutano a migliorare gli studi molecolari epidemiologici su ASFV. (C. Gallardo et al., 2009; Nix et al., 2006)

La ricerca genomica sul virus ha raggiunto nuovi traguardi grazie allo sviluppo di tecnologie di sequenziamento, clonazione genica e PCR, ma soprattutto a seguito della creazione nel 1948 di una libreria genomica che contiene il 98% delle informazioni genomiche del virus. (Ley et al., 1984)

Genotipizzazione p72/vp73 (B646L)

Uno dei primi target utilizzato per la genotipizzazione di ASFV è proprio la principale proteina del capsido virale, p72. (Tabarès et al., 1980)

Dal momento che B646L (che codifica per la proteina p72) è un gene relativamente stabile e conservato, quando un ceppo è endemico in un territorio non si osservano variazioni genotipiche che lo riguardino. I cluster genotipici che si basano sulla differenziazione di p72 possono aiutare a rintracciare la fonte del virus da un punto di vista molecolare per tracciare la rotta di trasmissione di ASFV. (Malogolovkin & Kolbasov, 2019)

A partire dai primi studi di Lopez-Otin et al. nel 1990 (López-Otín et al., 1990) l'analisi del gene B646L continua ad avere un ruolo preponderante come criterio per la classificazione e differenziazione dei genotipi virali.

Risale al 2017 la scoperta del genotipo XXIII di ASFV, individuato in Etiopia tra il 2011 e il 2014 (Achenbach et al., 2017); il virus sembra derivare dallo stesso albero evolutivo dei genotipi IX e X, diffusi in Africa orientale e nella Repubblica Democratica del Congo.

Nel 2018 è stato individuato il genotipo XXIV all'interno di campioni di zecche molli del Mozambico. (Quembo et al., 2018). Oggi il genotipo più preoccupante in Europa è il genotipo II.

Altri studi suggeriscono che possano esistere altri genotipi di ASFV non ancora identificati e che ci siano nuovi markers che possono essere utilizzati per classificarli. (Achenbach et al., 2017; C. Gallardo et al., 2014)

GENOTIPI MAGGIORMENTE DIFFUSI

GENOTIPO I

Tutti e 24 i genotipi identificati sono stati ritrovati in Africa, soprattutto nelle regioni del Sud Est.

ASFV genotipo I è stato isolato per la prima volta al di fuori dell'Africa nel 1957 a Lisbona (Revilla et al., 2018b). Da quel momento il virus si è diffuso in Portogallo, Spagna, Cuba, Brasile e altri paesi tra gli anni '50 e '90 (Galindo & Alonso, 2017; Sánchez-Vizcaíno et al., 2015).

Il genotipo I è stato identificato anche nei focolai che sono scoppiati negli anni '60 in Europa occidentale e negli anni '70 nelle regioni caraibiche e nell'USSR (oggi Ucraina). Nel 2021 il

genotipo I è stato rilevato per la prima volta anche in campioni clinici provenienti dalla Cina. (Sun et al., 2021)

Attualmente questo genotipo virale è ancora dominante in alcuni paesi dell'Africa occidentale, nessun focolaio è stato segnalato in Nord Africa (Mulumba-Mfumum et al., 2019).

In Africa Centrale prevalgono contemporaneamente il genotipo I e il II di ASFV.

Fino a qualche anno fa tutti i paesi al di fuori dell'Africa, eccetto la Sardegna in cui il genotipo I è rimasto endemico, avevano eradicato ASFV. La situazione oggi è differente.

GENOTIPO II

A partire dalla sua introduzione in Georgia nel 2007 ASFV genotipo II ha dato il via ad una vera e propria epidemia che riguarda attualmente gran parte del mondo.

La coesistenza del genotipo I e del genotipo II in Cina ha sottolineato che le azioni di controllo e prevenzione sono fondamentali, accelerando lo sviluppo dei vaccini (Sun et al., 2021).

Genotipizzazione CVR (9RL/B602L)

Il metodo di genotipizzazione basato sul gene B646L è accettato da molti ricercatori, ma non si dimostra esaustivo nel distinguere virus con differenti fenotipi biologici. Queste differenze possono essere evidenziate con una valutazione della regione CVR del gene B602L. (Gallardo et al., 2009b).

ASFV contiene un CVR approssimativamente di 400 bp che si trova all'interno della regione centrale di 125 kb, che rimane stabile. (Sumption et al., 1990)

Grazie allo studio di Irusta et al. nel 1996 è stata individuata la sequenza CVR nel genoma del virus ed è stato scoperto che codifica per dei tetrameri di amminoacidi ripetuti all'interno di un gene responsabile della risposta tardiva (ORF 9RL) nei virus di genotipo I. L'analisi del numero e della composizione di questi tetrameri all'interno del CVR può essere utile per raggruppare gli isolati ASFV. (IRUSTA et al., 1996)

Si ritiene che la classificazione che si basa sulle variazioni di CVR possa essere complementare a quella che ricorre a p72 (Phologane et al., 2005) ma, sebbene sia utilizzata per distinguere tra isolati strettamente correlati, servirebbero ulteriori studi che prendano in esame altre regioni genetiche per confermarlo. (Vilem et al., 2020)

Genotipizzazione p54 (E183L)

Il gene E183L, che codifica per la proteina p54, concorre a perfezionare la genotipizzazione che si basa su p72. Questa classificazione è utilizzata come indice ausiliario per le analisi filogenetiche, poichè le differenze riscontrate non sono così significative. (Qu et al., 2022)

Altri metodi

Per valutare le differenze evolutive tra varianti molto simili di ASFV , in particolar modo per ripercorrere le rotte delle varianti nella stessa regione, è possibile utilizzare anche altri metodi di genotipizzazione, come la valutazione del gene codificante per la proteina p30 (CP204L) (Rowlands et al., 2008; Sanna et al., 2017; Simulundu et al., 2017), le sequenze ripetute in tandem (TRS) all'interno delle regioni intergeniche (IGR) tra i geni I73R e I329L (C. Gallardo et al., 2014; Goller et al., 2015; Sanna et al., 2017), il gene EP402R che codifica per la proteina CD2v (Sanna et al., 2017), il gene per la timidina chinasi (Onzere et al., 2018), il gene J268L (Nix et al., 2006), Bt/Sj (Nix et al., 2006), il gene KP86R (Nix et al., 2006), il gene O174L (Mazur-Panasiuk & Woźniakowski, 2019) e la regione C315R/C147L (Farlow et al., 2018).

Gallardo et al. hanno scoperto che l'intero genoma di ASFV presenta diverse combinazioni di sequenze ripetute in tandem (TRS) nella regione intergenica (IGR) dei geni I73R e I329L.

Ad esempio, l'IGR degli isolati polacchi e lituani di PSA si è rivelata essere uguale a quella degli isolati bielorusi e ucraini ma diversa da quella degli isolati russi, suggerendo che i ceppi prevalenti di ASFV in Polonia e Lituania potrebbero aver avuto origine in Bielorussia (C. Gallardo et al., 2014; H. Zhang et al., 2023)

In seguito si è scoperto che il ceppo virale isolato in Russia aveva mostrato una variazione nel sito IGR dal 2012, suggerendo che il ceppo epidemico della PSA nell'UE potrebbe provenire dalla Russia.

Nel 2019, il ceppo virale (Cina/Guangxi/2019), che presentava due sequenze ripetute in tandem nel sito IGR è stato rivendicato principalmente in Cina, e denominato IGR-III (Ge et al., 2019). Successivamente, questo ceppo virale è apparso anche in Corea (S. Kim et al., 2021) e Vietnam (Nguyen et al., 2022)

Questi esempi dimostrano l'importanza che le nuove tecniche di genotipizzazione rivestono nel ripercorrere la storia evolutiva di ciascun isolato.

SIEROGRUPPI

ASFV è uno dei pochi virus che non comportano lo sviluppo di anticorpi neutralizzanti nell'ospite infetto. (Dimmock, 1993)

Nel 1963 sono stati individuati per la prima volta i diversi sierogruppi antigenici di ASFV, attraverso prove di inibizione dell'emoagglutinazione (HAI), utili a valutare la reattività crociata sierologica di differenti isolati ASFV in vitro. (Malmquist & Hay, 1960)

Questa metodica è stata largamente impiegata come strumento di ricerca e classificazione dei sierotipi nell'Istituto Pokrov in Russia (Centro Federale di ricerca per la virologia e microbiologia). Sono stati identificati in totale 8 sierogruppi (SG) tramite HAI. Sarebbe possibile identificarne degli altri se si considerassero come parametri anche la densità di emoadsorbimento (numero di globuli rossi per cellula infettata) o le mappe di contatto degli eritrociti. (Malogolovkin & Kolbasov, 2019)

Ad oggi la metodica HAI rappresenta il gold standard della sierotipizzazione di ASFV, ma ci sono dei limiti: il siero utilizzato per la ricerca proviene da suini convalescenti e gli anticorpi virali sono prodotti tardi e a basso titolo. È necessario identificare degli altri determinanti antigenici. Secondo alcuni studi CD2v (EP402R) e C-type lectin (EP153R) sono strettamente legati all'emoadsorbimento di ASFV, sebbene questi geni risultino molto diversi nelle diverse varianti di ASFV. (Malogolovkin et al., 2015; Thanh et al., 2021)

Sono state effettuate varie analisi filogenetiche che hanno confermato la veridicità delle classificazioni basate su CD2v/C-type lectin, confermando la classificazione in 8 SG, come riscontrato con HAI. Anche gli studi su piccoli frammenti delle sequenze di EP402R hanno confermato questo risultato. Secondo Malogolovkin affiancando alla genotipizzazione con p72 anche la sierologia (HAI) otteniamo un metodo più completo per differenziare i fenotipi virali biologicamente più rilevanti. (Malogolovkin et al., 2015)

MECCANISMI PATOGENETICI

TRASMISSIONE

ASFV è un virus estremamente stabile, che infetta esclusivamente membri della famiglia Suidae.

A partire dalla sua comparsa in Kenya nel 1921, ASFV è rimasto endemico in Africa, all'interno di un ciclo selvatico che coinvolge le zecche molli del genere *Ornithodoros* e i suini selvatici

Africani, tra cui il facocero comune (*Phacochoerus africanus*) e il potamocero (*Potamochoerus larvatus*) che sembrano essere resistenti alla malattia e non sviluppano segni clinici.

I suini domestici (*Sus scrofa domesticus*) e i cinghiali Eurasiatici (*Sus scrofa ferus*) sono suscettibili all'infezione, che si può manifestare in forme molto gravi, con tassi elevati di mortalità, normalmente dopo pochi giorni dal primo contatto con il virus (Gaudreault et al., 2020).

ASFV diffonde facilmente attraverso il contatto diretto con soggetti infetti, attraverso il traffico di prodotti suinicoli contaminati o attraverso l'azione di vettori ematofagi, appartenenti alla famiglia *Argasidae*, genere *Ornithodoros*. (Lv et al., 2022)

La fonte maggiore di contagio in Africa è costituita proprio dai vettori biologici, presenti anche in Europa e in America. L'eradicazione è complicata anche dalla durata del ciclo vitale delle zecche e dalla loro tendenza a persistere e sopravvivere sui facoceri, nelle gabbie o nei recinti dei suini domestici. (Gaudreault et al., 2020) ASFV ha la capacità di persistere nell'ambiente anche per varie settimane, all'interno di matrici proteiche, se protetto dalla luce solare e dall'essiccamento. (L. K. Dixon et al., 2020)

Secondo recenti studi è emerso che anche le sanguisughe (*Hirudo medicinalis*) possano fungere da reservoir per la patologia. (Karalyan et al., 2019)

La mosca delle stalle, *Stomoxys calcitrans*, può fungere da vettore meccanico per il virus dopo 24 ore dal contatto con sangue infetto, ma solo per via ingestiva e solo negli ospiti sensibili. La sopravvivenza del virus all'interno delle mosche è di circa paio di giorni. (MELLOR et al., 1987)

Olesen et al. hanno dimostrato che è possibile rintracciare ASFV vitali nelle mosche nutrite con sangue infetto fino a 12 ore dopo il pasto di sangue, e ritrovare il DNA virale al loro interno fino a tre giorni dopo. Il titolo virale contenuto in una mosca è sufficiente a provocare la comparsa di segni clinici in un suino infettato. (Olesen, Hansen, et al., 2018)

Questa modalità di trasmissione appare sicuramente plausibile tra soggetti all'interno dello stesso allevamento, ma risulta impossibile tra allevamenti a lunga distanza. (Forth et al., 2018; Olesen, Hansen, et al., 2018; Olesen, Lohse, et al., 2018)

CICLI EPIDEMIOLOGICI

È possibile descrivere quattro cicli epidemiologici per spiegare le modalità di trasmissione di ASF: ciclo selvatico, ciclo zecca-suino, ciclo domestico, ciclo cinghiale – habitat. (Chenais et al., 2018)

Il **ciclo selvatico** è stato osservato nelle zone Sud Est dell’Africa, in cui la trasmissione del virus avviene tra il vettore (zecche molli della specie *Ornithodoros spp*, in particolare *O. moubata*), il facocero comune (*Phacochoerus africanus*), il potamocero (*Potamochoerus larvatus*) (M.-L. Penrith, 2009)

Il **ciclo zecca-suino** avviene prevalentemente nell’Africa Sub-Sahariana e nella Penisola Iberica. (Boinas et al., 2011), coinvolgendo zecche molli e suini domestici (*Sus scrofa domesticus* e *Sus scrofa*).

Il **ciclo domestico** è legato solo al suino domestico e alla movimentazione di prodotti da esso derivati (carne di maiale, grasso, lardo, ossa, midollo osseo, pelle), senza l’intervento di contagi da parte di suini che vivono in libertà o trasmissione da zecche. Si riscontra nella zona Ovest dell’Africa e in Brasile. (A.-A. Brown et al., 2018; MOURA et al., 2010)

Nel **ciclo cinghiale-habitat** i protagonisti sono i cinghiali (*Sus scrofa*) e la trasmissione dipende dalla presenza di carcasse infette nell’ambiente e dalla movimentazione di prodotti derivanti da suini e cinghiali infettati. (Chenais et al., 2018). È il ciclo che determina la persistenza di PSA in Europa.

IL VETTORE BIOLOGICO

Argasidae

Le zecche *Ornithodoros* costituiscono l’unico vettore biologico proprio di ASFV. (Burrage, 2013)

Le zecche molli si nutrono ripetutamente di sangue sia nello stadio di ninfa che in quello di adulto, con possibilità di trasmettere il virus come vettori biologici ma anche meccanici.

Non tutte le zecche appartenenti al genere *Argasidae* sono in grado di trasmettere il patogeno. Attraverso studi epidemiologici e infezioni sperimentali è stato confermato che solo 8 taxa sono in grado di trasmettere ASFV: *Ornithodoros maroccanus*, *Ornithodoros moubata porcinus*, *Ornithodoros puertoricensis*, *O. erraticus*, *Ornithodoros moubata complex*, *Ornithodoros turicata*, *Ornithodoros savignyi*, e *Ornithodoros coriaceus*. (Golnar et al., 2019)

Ixodidae

È stato dimostrato che alcune zecche dure appartenenti al genere *Ixodidae*, come *Dermacentor reticulatus* e *Ixodes ricinus*, sono in grado di ospitare il virus. Le zecche dure europee potrebbero essere un possibile vettore per ASFV.

Risulta che il DNA di ASFV possa essere rintracciato al loro interno rispettivamente fino a 6 o più di 8 settimane dall'infezione, ma non ci sono prove del fatto che possano trasmettere ASFV. (de Carvalho Ferreira et al., 2014)

Il rischio maggiore nel caso in cui si dimostrasse che il virus fosse trasmissibile anche dalle zecche dure, deriverebbe dalla loro capacità di rimanere adese all'ospite per lungo tempo, agendo da vettori meccanici. (Lv et al., 2022)

CICLO SELVATICO

Il ciclo selvatico di ASFV si realizza principalmente nell'area Sud Est dell'Africa.

La trasmissione del virus avviene per contatto tra le zecche molli *O.moubata* e gli esemplari più giovani di facocero. (M. Penrith et al., 2019) (Jori & Bastos, 2009)

I facoceri (*Phacochoerus africanus*) costituiscono i principali ospiti selvatici africani, risultano portatori asintomatici e reservoir per la patologia. (Lv et al., 2022)

L'infezione è garantita dalla puntura del vettore. La zecca diviene portatrice del virus a seguito di un pasto di sangue su un facocero infetto e in fase viremica. (PLOWRIGHT et al., 1969; Thomson et al., 1980)

È stato dimostrato che il facocero viremico deve presentare un titolo ematico di ASFV di almeno 10^3 HAD50/ml per poter infettare la zecca nel corso del pasto di sangue.

Un titolo così alto è riscontrabile solo nei soggetti giovani, negli adulti si riscontrano raramente titoli superiori a 10^2 HAD50/ml. (Jori & Bastos, 2009; Thomson et al., 1980)

Tra gli esemplari della specie *Ornithodoros* ASFV viene trasmesso per via transovarica, transstadiale e sessuale. (Kleiboeker et al., 1999)

La presenza dei potamoceri come ospiti selvatici gioca un ruolo meno importante in questo ciclo, poiché il loro comportamento etologico ne riduce l'interazione con le zecche molli, sebbene siano comunque in grado di essere infettati e di trasmettere ASFV. (M. Penrith et al., 2019)(Jori & Bastos, 2009)

Il ciclo selvatico è stato riscontrato anche in Europa con il coinvolgimento di *O. erraticus* e dei cinghiali (*Sus scrofa*). (Jori & Bastos, 2009). In Europa, diversamente dal ciclo africano, ASFV perpetua la sua presenza nella popolazione suinicola selvatica e domestica attraverso una trasmissione orizzontale più che da vettore. (Pietschmann et al., 2016)

CICLO ZECCA-SUINO

È un ciclo descritto soprattutto in Africa sub- Sahariana e descrive il ruolo delle zecche molli (*Ornithodoros*) come importantissimo fattore di rischio per la trasmissione di ASFV ai suini domestici (*Sus scrofa domestica*). (Lv et al., 2022)

MODALITA' DI TRASMISSIONE DI ASFV DALLE ZECCHE

Sulla base dell'importanza di questa modalità di trasmissione sono stati condotti vari studi che ricostruiscono la dinamica dell'infezione da vettore, come riportato dalla review di Qu e al. (Qu et al., 2022)

Il vettore modello è la zecca molle *O. porcinus*. L'infezione ha inizio con il pasto di sangue della zecca su un suino in uno stato di viremia. A seguito dell'ingestione di ASFV con il sangue, l'intestino medio della zecca risulta essere il primo sito di replicazione del virus (Greig, 1972b).

Si può supporre che l'ingresso del virus all'interno delle cellule epiteliali intestinali del vettore possa essere collegato con la sua fagocitosi da parte degli eritrociti, perché alcuni eritrociti intatti e infetti sono stati ritrovati all'interno di fagolisosomi nelle stesse cellule epiteliali intestinali.

Dopo l'ingestione ASFV super la parete intestinale e penetra l'emocele, le ghiandole coxali, l'ampolla rettale, le ghiandole salivari. Secondo gli studi di Greig et al. del 1972 è possibile rintracciare ASFV all'interno di questi tessuti entro 24-48 ore dall'infezione. (Greig, 1972b)

Studi più recenti di Kleiboeker hanno dimostrato la necessità di un intervallo di tempo di 15-21 giorni affinché si realizzi la generalizzazione di ASFV nella zecca, ciò suggerirebbe l'esistenza di una barriera a livello del medio intestino del vettore. (Kleiboeker et al., 1998)

Dopo la generalizzazione nei tessuti della zecca il titolo di ASFV rimane di 6log HAD50/mg rispetto al peso del vettore per 290 giorni (durante il periodo di campionamento che dovrebbe combaciare con la durata dell'infezione naturale nelle zecche). (Kleiboeker et al., 1998; Thomson et al., 1980) I titoli di ASFV nei tessuti riproduttivi e nelle ghiandole salivari cresce fino ad arrivare a 5-6log₁₀ HAD50/mg dopo 91 giorni dall'infezione, il valore più alto riscontrato in qualsiasi tessuto. (Kleiboeker et al., 1998)

La trasmissione di ASFV dal vettore *O. porcinus* infetto al suino avviene con successo se si riscontrano titoli alti a livello delle ghiandole salivari e delle ghiandole coxali, l'escrezione del virus avviene infatti attraverso queste secrezioni. (Plowright et al., 1970)

Le secrezioni provenienti dalle ghiandole coxali presentano titoli più alti di ASFV rispetto alle salivari, anche esse sono un'importante fonte di trasmissione. (Kleiboeker et al., 1998)

La pelle costituisce l'interfaccia tra la zecca e l'ospite, il punto in cui avviene il morso è quello in cui si ha la trasmissione del virus. La saliva delle zecche è un cocktail biologico cruciale nell'inibire le difese immunitarie dell'ospite. Attraverso la promozione della vasodilatazione nel distretto in cui è avvenuto il morso, vengono riversate in circolo le molecole coinvolte nel processo citolitico, anticoagulante, anti-infiammatorio, anti-chemochine, antidolorifico. (Šimo et al., 2017) La saliva inoculata dalle zecche molli ha la capacità di sopprimere la risposta immunitaria innata, il sistema del complemento e l'immunità adattativa dell'ospite.

In Africa e Madagascar l'isolamento di esemplari di *O. moubata* infetti in aree con focolai di PSA ha suggerito che la presenza stessa delle zecche sia un fattore di rischio per il mantenimento di ASFV nell'ambiente. (Haresnape et al., 1988; Ravaomanana et al., 2010; Wilkinson et al., 1988)

Nella penisola Iberica sono gli esemplari di *O. erraticus* a garantire il mantenimento di ASFV nell'ambiente. (Basto, Nix, et al., 2006; Boinas et al., 2011; Perez-Sanchez et al., 1994)

E' stato sperimentalmente dimostrato che anche il genotipo Il Georgia 2007/1, responsabile dell'epidemia in territorio Europeo, è in grado di replicare in maniera efficace in zecche *O. erraticus* vive. (Diaz et al., 2012)

Questo ciclo infettivo zecca-suino è particolarmente evidente in Europa Centrale, nelle nazioni baltiche e in Asia, favorendo il dilagare dell'infezione verso suini domestici e selvatici. (Frant et al., 2017) Non ci sono prove del fatto che lo scoppio dei focolai di PSA in Cina nel 2018-2020 sia connesso alla presenza di zecche molli, che costituiscono un rischio molto basso nel paese. (Cheng & Ward, 2022) Secondo i modelli di predizione di Li et al. la costa sudest e la regione centrale della Cina risulterebbero adatte alla diffusione di ASFV e le condizioni ambientali potrebbero creare un habitat idoneo alla permanenza delle zecche molli, questi fattori potrebbero scatenare lo scoppio di nuovi focolai in queste zone con queste modalità di infezione. (Y. Li et al., 2022)

CICLO DOMESTICO

I suini domestici infetti costituiscono una delle fonti di contagio più rischiose per gli altri suini suscettibili. Le epidemie causate da ceppi particolarmente virulenti mostrano alti tassi di morbilità e mortalità tra i suini domestici. (Costard et al., 2013)

Il contatto diretto risulta essere una modalità di contagio particolarmente efficace e in grado di diffondere il virus ad altri suini domestici o selvatici. (Costard et al., 2013; Guinat et al., 2016)

I livelli di trasmissione dei ceppi ad alta/moderata/bassa virulenza risultano differenti sulla base delle diversità nei livelli di viremia e di contaminazione virale. (Boinas et al., 2004; Guinat et al., 2016; Olesen et al., 2017)

La modalità di trasmissione indiretta sfrutta invece mezzi quali sangue, fluidi corporei, feci e carcasse di suini infetti. (Guinat et al., 2016) I soggetti che guariscono dall'infezione causata da ceppi a bassa/moderata virulenza possono diventare portatori subclinici in grado di diffondere il virus ad altri soggetti suscettibili. (Eblé et al., 2019; C. Gallardo, Soler, et al., 2015; Guinat et al., 2016; Petrov et al., 2018)

Una via particolarmente rischiosa di diffusione del virus è la movimentazione illegale di suini infetti o di prodotti di derivazione suinicola contaminati. Questa modalità ha avuto un ruolo rilevante nello scoppio dei focolai in Africa, Europa e Asia. (Gogin et al., 2013; M.-L. Penrith et al., 2013; Zhou et al., 2018)

Numerosi studi dimostrano che i cinghiali della zona Eurasiatica siano altamente sensibili all'infezione da parte dei ceppi più virulenti di ASFV, in particolar modo al genotipo II, largamente diffuso in Europa. (Blome et al., 2012; Gabriel et al., 2011)

Il contatto tra cinghiali selvatici e suini domestici ha dato un contributo notevole alla diffusione del virus in Europa dell'Est, nel Caucaso e nella Federazione Russa, dove è comune trovare piccoli allevamenti suinicoli con cortili all'aperto con scarse misure di biosicurezza. (Gogin et al., 2013) I cinghiali portatori di ASFV sono stati rintracciati in tutta Europa e il fatto che le rotte degli animali selvatici sfuggano al controllo umano costituisce un'ulteriore fonte di rischio, oltre a non consentire il controllo e l'eradicazione della patologia dai territori in questione. (Gaudreault et al., 2020)

Le altre modalità di trasmissione dipendono dall'elevata stabilità di ASFV nell'ambiente.

Anche l'importazione di prodotti a base di carne suina infetti e la contaminazione di attrezzature, mangimi, veicoli e indumenti possono comportare un rischio di diffusione del patogeno. (Costard et al., 2013)

ASFV rimane vitale in un'ampia varietà di mangimi animali, anche in condizioni ambientali estreme, incluse quelle riscontrabili durante i trasporti attraverso rotte trans atlantiche. (Dee,

Bauermann, Niederwerder, Singrey, Clement, de Lima, Long, Patterson, Sheahan, Stoian, Petrovan, Jones, Jong, et al., 2018; Stoian et al., 2019) È stato dimostrato che anche i liquidi contaminati e i mangimi a base vegetale possano fungere da vettore per il virus. (Niederwerder et al., 2019) È possibile ricondurre principalmente i focolai rilevati nel Caucaso, nella Federazione Russa e in Cina alla movimentazione di questi prodotti infetti e all'alimentazione dei suini domestici con rifiuti contaminati. (Gogin et al., 2013; Zhou et al., 2018)

CICLO CINGHIALE – HABITAT

E' un ciclo di recente caratterizzazione, riportato dallo studio di Chenais et al., che descrive la situazione epidemiologica riscontrabile in Europa, in particolar modo negli stati Baltici e in Polonia dal 2014. Questo ciclo presenta un nuovo pattern che coinvolge i cinghiali come reservoir del virus all'interno dell'ambiente. (D. Beltrán-Alcrudo et al., 2017)

Un ciclo simile venne descritto in Sardegna nel 1978. (Costard et al., 2013)

Il ciclo cinghiale-habitat è caratterizzato da una modalità di trasmissione diretta che coinvolge cinghiali infetti e cinghiali suscettibili, e da una modalità indiretta, che prevede la trasmissione del patogeno da carcasse contaminate presenti nell'ambiente.

La contaminazione dell'habitat è data principalmente dalla presenza di carcasse di cinghiali positive ad ASFV, e offre la possibilità di sviluppo di infezioni sia a basse che ad alte dosi. L'intensità dell'infezione dipende dalle caratteristiche ambientali come il tipo di paesaggio, il meteo, la stagione, il grado di decomposizione delle suddette carcasse.

Questi fattori epidemiologici si intrecciano con fattori propri della popolazione dei cinghiali selvatici, come la demografia e la fertilità nel gruppo.

Si aggiungono fattori manageriali dovuti all'intervento umano: la somministrazione di cibo, per evitare un crollo demografico nei cinghiali nei periodi invernali, le tecniche di caccia e il numero di capi che è possibile cacciare.

Risulta che ci sia una correlazione positiva tra la densità di cinghiali abitanti le aree studiate e la presenza di AFSV nei capi, (D. Beltrán-Alcrudo et al., 2017) anche se sembra che la densità stessa non sia un fattore che limita la persistenza ambientale. ("Evaluation of Possible Mitigation Measures to Prevent Introduction and Spread of African Swine Fever Virus through Wild Boar," 2014). La persistenza del virus all'interno delle carcasse per lungo tempo comporta un alto tasso di permanenza del virus nell'ambiente, nonostante lo spopolamento di alcune

aree e la mortalità dei soggetti. (Depner et al., 2017). Questa persistenza è favorita dalle temperature e dai climi freddi e umidi che preservano il virus, anche in assenza di soggetti suscettibili.

Nonostante i vari cicli siano indipendenti tra loro risulta possibile anche una trasmissione della patologia **intericlo**. A causa dell'intervento umano si potranno avere degli incroci tra il ciclo domestico e il ciclo cinghiale-habitat, provocando una diffusione del virus anche a lunga distanza e andando così ad aumentare le aree geografiche coinvolte. (Chenais et al., 2018)

RISPOSTA IMMUNIARIA

L'immunità protettiva contro il virus della PSA è poco conosciuta, come riportato da Urbano et al. (Urbano & Ferreira, 2022) Come nella maggior parte delle infezioni virali, l'immunità innata e le risposte immunitarie umorali e cellulari sembrano essere importanti per la protezione.

Nonostante precedenti studi suggerissero la mancanza di attività neutralizzante degli anticorpi contro il virus, le prove della presenza di anticorpi neutralizzanti sembrano essere presenti (Escribano et al., 2013; Rock, 2021). La neutralizzazione mediata da anticorpi presenta alcune caratteristiche non comuni e poco conosciute. Si verifica ad esempio la perdita di suscettibilità alla neutralizzazione a causa dei passaggi del virus in colture cellulari, per via di modifiche nella composizione fosfolipidica delle membrane virali e/o per la presenza di anticorpi bloccanti nel siero, che inibiscono la completa neutralizzazione (Escribano et al., 2013).

L'emoagglutinina CD2v/EP402R del virus ASFV è forse la proteina virale implicata in modo più significativo nell'immunità protettiva (Arias, De la Torre, et al., 2017; RUIZ-GONZALVO et al., 1996).

CD2v, insieme a C-type Lectin/EP153R (l'antigene HA ausiliario virale) è annoverata anche tra i geni ortologhi più variabili tra gli isolati di ASFV, fornendo antigeni potenzialmente significativi nell'immunità sierogruppo-specifica.

L'immunità protettiva sierotipo-specifica verso i sierotipi che inibiscono l'emoadsorbimento (HAI) è un concetto recente, supportato da dati che indicano che la genotipizzazione basata su p72 non sia perfettamente correlata né alla protezione crociata omologa né a quella eterologa. Ceppi distinti sono talvolta in grado di indurre protezione crociata mentre i ceppi che appaiono strettamente correlati non riescono a determinare la stessa cross protezione. Sebbene CD2v e C-type lectin siano importanti per mediare le risposte protettive crociate in vivo, non

conferiscono una protezione omologa sierotipo-specifica completa (Burmakina et al., 2019; Malogolovkin & Kolbasov, 2019).

Diversi studi dimostrano che i virus attenuati con delezioni del gene CD2 o mutazioni troncanti N-terminali nei geni CD2v/ C-type lectin (quindi, presumibilmente, privi di proteine) proteggono i suini e i cinghiali dall'attacco di ceppi virali virulenti (Leitão et al., 2001a; C. A. L. Oura et al., 2005), indicando che è necessario identificare ulteriori antigeni protettivi.

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

Oltre alla neutralizzazione del virus sono stati identificati altri ruoli potenzialmente protettivi degli anticorpi contro ASFV, tra cui i meccanismi di citotossicità cellulo-mediata anticorpo-dipendente (ADCC) e di citotossicità mediata dal complemento (CDC) (Arias, de la Torre, et al., 2017; Escribano et al., 2013; Takamatsu et al., 2013; Zsak et al., 1993).

È possibile che anche l'immunità cellulare sia essenziale per la protezione.

I ruoli chiave sono interpretati dalle cellule natural killer (NK) e dalle cellule T CD8+; Leitão et al. hanno dimostrato un'elevata attività delle cellule NK verso ASFV nei suini infettati con il ceppo naturalmente attenuato NHV/NHP68 e gli animali testati sono sopravvissuti all'infezione con l'isolato altamente virulento L60. (Leitão et al., 2001a)

Alonso et al. (F. Alonso et al., 1997) hanno dimostrato la lisi CD8-dipendente delle cellule infette da PSA in modelli sperimentali con isolati virali attenuati.

Oura et al. hanno evidenziato che la deplezione di questo insieme di cellule mediata da anticorpi ha soppresso la protezione. (C. A. L. Oura et al., 2005)

Schäfer et al. (Schäfer et al., 2021) e Hür et al. (Hühr et al., 2020) hanno messo in luce che la risposta immunitaria nei cinghiali selvatici e nei suini domestici si basa principalmente sull'aumento di CD4⁻/CD8⁺ durante l'infezione con ASFV moderatamente virulenti e sull'aumento di cellule T CD4⁺/CD8⁺ (DP) durante l'infezione con un virus altamente virulento (l'isolato Armenia08). L'aumento della frequenza di comparsa delle cellule T effettrici $\gamma\delta$ nei cinghiali è stato suggerito come spiegazione della maggiore virulenza in questa sottospecie.

Gli autori hanno riportato alterazioni significative nella frequenza di comparsa delle cellule T natural killer invarianti (iNKT)(Schäfer et al., 2019) e nei loro pattern di attivazione (Schäfer et al., 2021) durante l'infezione, supportando i risultati di Leitão et al. e l'idea che questo sottoinsieme di cellule prenda parte alla risposta antivirale contro il virus della PSA. (Leitão et al., 2001a)

Nonostante le complicazioni derivanti dall'eterogeneità della popolazione di cellule T (Jenson et al., 2000) e dalla variabilità nella presentazione dell'antigene che lega MHC all'interno della popolazione di suini outbred (Arias, de la Torre, et al., 2017), sono stati identificati determinanti molecolari T CD8+ specifici per PSA con potenziale protettivo nei geni G1340L, p30, p72 , CD2v e nelle proteine virali C-type lectin (F. Alonso et al., 1997; Argilaguet et al., 2012; Burmakina et al., 2019; Leitão et al., 2000); il loro ruolo nella protezione, tuttavia, non è completamente chiarito.

È in corso di sviluppo un ulteriore studio indirizzato verso l'identificazione di altri determinanti delle cellule T CD8+ sia nei ceppi attenuati che in quelli virulenti, e al chiarimento del loro potenziale protettivo (Goatley et al., 2020; Netherton, Goatley, et al., 2019).

In conclusione, le prove disponibili indicano che l'induzione della protezione coinvolge sia meccanismi anticorpali che mediati da cellule, ma gli antigeni e i tipi di risposte cellulari richiesti necessitano di un'ulteriore caratterizzazione. (Urbano & Ferreira, 2022)

EVASIONE dell'IMMUNITA' INNATA

I meccanismi messi in atto da ASFV per evadere l'immunità innata sono ad oggi oggetto di studio, come riportato da Zheng et al. (X. Zheng et al., 2022)

Inibizione della produzione o del funzionamento di IFN - Gli interferoni presentano grandi differenze nella loro struttura, nella distribuzione dei recettori e nelle attività biologiche tessuto-specifiche, ma sono tutti in grado di produrre una risposta antivirale (van Boxel-Dezaire et al., 2006). Gli interferoni IFNs di tipo I (IFN-I) costituiscono una delle prime linee di difesa atte a limitare la replicazione e diffusione virale, promuovendo la produzione di molteplici proteine ad azione antivirale, che interferiscono con ogni fase del ciclo del virus.

Quando un virus infetta un ospite, vari recettori dell'immunità innata (PRRs o pattern recognition receptors), inclusi i recettori Toll-like (TLRs), i recettori RIG-I-like (RLRs) e i sensori citoplasmatici del DNA, riconoscono dei pattern molecolari associati ai patogeni (PAMPs) e

scatenano l'attivazione delle vie di segnalazione dell'immunità innata, affinché siano prodotte citochine dal ruolo proinfiammatorio e IFN-I (Zhu et al., 2019).

A causa della loro evoluzione i virus sono in grado di sviluppare delle strategie per contrastare le cascate di segnalazione del sistema IFN e poter replicare indisturbati. Recenti studi hanno dimostrato che i ceppi più virulenti di ASFV sono in grado di sopprimere l'espressione di IFNs e dei geni la cui espressione è stimolata dagli IFNs (ISGs) nelle cellule infette (García-Belmonte et al., 2019; D. Li et al., 2021; Razzuoli et al., 2020). È stato dimostrato che alcune proteine virali sono in grado di inibire le risposte IFN-I, tra di esse è possibile annoverare la famiglia multigeni 360 (MGF360), la MGF530/505, pI329L, pDP96R, pE120R, e pI215L.

Regolazione della risposta infiammatoria - La risposta infiammatoria indotta da ASFV gioca un ruolo importante nella patogenesi dell'infezione. È stato riportato che ASFV induce i macrofagi a rilasciare TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 e altre citochine infiammatorie (F. Zhang et al., 2006).

I livelli di TNF- α , IL-12p40, IL-23, IL-17, e G-CSF nei sieri dei suini infetti da ASFV mostrano un aumento significativo (Karalyan et al., 2016; Zakaryan et al., 2015) nelle infezioni.

Attualmente si ritiene che il virus ASFV possa indurre una risposta infiammatoria molto forte, portando a gravi lesioni infiammatorie e alla morte dei suini infetti. Esistono numerosi studi che dimostrano che il livello di fattori infiammatori indotti dall'infezione da parte di ceppi di ASFV a bassa virulenza sia significativamente più alto di quello indotto da ceppi ad alta virulenza. Alcuni esempi: l'espressione di IFN- α , TNF- α e IL-12p40 indotta dal ceppo a bassa virulenza ASFV/NH/P68 è molto più elevata di quella indotta dal ceppo ad alta virulenza ASFV/L60 nei macrofagi (Gil et al., 2008). Rispetto al ceppo ad alta virulenza ASFV/Benin97/1, il ceppo a bassa virulenza ASFV/OURT88/3 induce i macrofagi a produrre livelli più elevati di IL-1 α , IL-1 β , IL-18, CCL4, CXCL10 (Fishbourne et al., 2013; Franzoni et al., 2018).

Questi risultati suggeriscono che i ceppi ad alta virulenza del virus della PSA siano in realtà in grado di modulare la produzione di fattori pro-infiammatori come meccanismo di evasione della risposta immunitaria dell'ospite.

È stato confermato che alcune proteine, tra cui pA238L, pMGF505-7R, pL83L e pF317L e pS273R inibiscono la risposta infiammatoria. Uno studio più recente ha dimostrato che pS183L, pE199L, pO61R e pI7L sono capaci di attivare la risposta infiammatoria, mentre pI226L, pA151R, pNP419L e pQP383R la inibiscono (Song et al., 2020).

Modulazione del meccanismo di apoptosi - L'apoptosi è un processo di morte cellulare programmata messo in atto negli organismi pluricellulari. Questo meccanismo gioca un ruolo importante nella patogenesi di varie infezioni virali, è considerata un ottimo strumento di difesa naturale dell'ospite ed è in grado di inibire la replicazione virale ed eliminare le cellule infettate dal virus. Numerosi virus hanno sviluppato delle strategie per prevenire o ritardare il processo di apoptosi cellulare, garantendo la sopravvivenza della cellula infettata per un periodo di tempo sufficiente a garantire la produzione di una quantità adeguata di virus (Y. Chen & Lin, 2017; D'Arcy, 2019; Fan, 2019).

L'induzione del meccanismo di apoptosi dei macrofagi infetti in vivo è uno dei markers di PSA in fase acuta (L. Dixon et al., 2017; Ramiro-Ibáñez et al., 1997). ASFV replica in gran numero e le proteine virali sono tradotte e modificate nel reticolo endoplasmatico, inducendo una risposta da stress nel reticolo stesso e attivando il segnale di inizio di apoptosi attraverso la caspasi-12, ATF6 e altre proteine (L. Dixon et al., 2017), che partecipano alle reazioni che innescano il meccanismo di morte cellulare programmata.

I mitocondri sono reclutati attivamente nella periferia delle *viral factories* in un sistema dipendente dai microtubuli. L'analisi morfologica suggerisce che i mitocondri reclutati forniscono attivamente ATP per la replicazione e l'assemblaggio del virus (Cobbold et al., 2000; Rojo et al., 1998). Il reclutamento mitocondriale può far parte anche della risposta antivirale che coinvolge l'apoptosi guidata dai mitocondri stessi (Netherton & Wileman, 2013).

Al fine di facilitare la replicazione virale e l'evasione della risposta immunitaria il virus codifica per alcune proteine in grado di ritardare il processo di apoptosi.

ASFV può essere trasmesso attraverso la fagocitosi di corpi apoptotici da parte dei macrofagi adiacenti quindi promuovere l'apoptosi può in realtà essere anche vantaggioso per la diffusione del virus, aumentando il rilascio dello stesso dalla cellula ed impedendo l'induzione di segnali infiammatori (L. Dixon et al., 2017; Vallée et al., 2001).

EVASIONE IMMUNITA' ADATTATIVA

L'infezione da ASFV non è in grado di indurre una risposta immunitaria adattativa significativa. Alcuni studi hanno evidenziato che è possibile la produzione di anticorpi protettivi nei suini immunizzati con ceppi di ASFV attenuati, e un numero elevato di anticorpi neutralizzanti può essere prodotto anche da suini che sono sopravvissuti all'infezione (Sánchez et al., 2019). L'esperimento di trasferimento adottivo di anticorpi ha confermato che i sieri di suini

immunizzati con un ceppo attenuato potrebbero migliorare la resistenza al ceppo omologo virulento nei suini sani (Onisk et al., 1994). I suinetti nati da scrofe sopravvissute all'infezione da ASFV possono a loro volta resistere all'infezione nel periodo di lattazione. Questi risultati implicano che gli anticorpi possano giocare un ruolo importante nell'ospite contro l'infezione da ASFV (Schlafer et al., 1984).

Allo stesso tempo le cellule T, NK ed NKT risultano comunque attivate nei suini immunizzati con i ceppi attenuati, il che migliorerà la resistenza dei suini ai ceppi omologhi virulenti (T. Wang et al., 2020).

L'immunità adattativa potrebbe rivestire un ruolo importante nella resistenza all'infezione ma, a causa dell'elevata patogenicità di ASFV e della sua interferenza con l'immunità innata, la maggior parte dei suini infettati morirà prima presentare una protezione immunitaria adattativa sufficiente. Nel processo di infezione alcune proteine potrebbero svolgere un ruolo importante nel compromettere l'immunità adattativa dell'ospite, come pEP402R e pEP153R, ad oggi oggetto di studio. (X. Zheng et al., 2022)

CAPITOLO II: SINTOMATOLOGIA E LESIONI ANATOMOPATOLOGICHE

ASFV è l'agente virale responsabile della Peste Suina Africana. Attualmente la PSA è inserita nella lista delle malattie infettive legalmente soggette a denuncia e, in quanto tale, la sua presenza deve essere segnalata all'Organizzazione Mondiale per la Salute Animale (WOAH).

La malattia nei suini domestici (*Sus scrofa*) è caratterizzata da decorsi clinici differenti che spaziano da una forma asintomatica, a forme peracuta, acuta, subacuta e cronica.

Questa variabilità dipende da più fattori tra cui lo stato immunitario del suino colpito e la virulenza del ceppo di ASFV responsabile dell'infezione.

Gli elementi cardine nella patogenesi della malattia sono rappresentati da:

- deplezione linfoide con linfopenia e induzione di uno stato di immunodeficienza
- alterazioni ematologiche con quadro emorragico.

I suini selvatici africani come i facoceri (*Phacochoerus africanus*) o i potamoceri (*Potamochoerus larvatus*) sono ospiti naturali del virus e reservoir, non mostrano segni clinici di malattia.

La replicazione di ASFV nelle cellule target dell'ospite e la risposta immunitaria attivata giocano un ruolo fondamentale nell'indurre i diversi quadri clinici della patologia, come esposto da Salguero et al. (Salguero, 2020)

SUINI DOMESTICI

La presentazione clinica e le lesioni patologiche nei suini colpiti da PSA possono variare a seconda della virulenza dell'isolato, della via e della dose di infezione, delle caratteristiche dell'ospite e dallo stato di endemicità del virus nella zona di insorgenza del focolaio. (Sánchez-Vizcaíno et al., 2015)

Gli isolati di ASFV si distinguono in ceppi ad alta, moderata o bassa virulenza. (Pan & Hess, 1984)

Le forme cliniche descritte nei suini possono essere classificate come peracute (o iperacute), acute, subacute o croniche, fino ad arrivare a forme asintomatiche (non evidenti). (Salguero, 2020)

Gli isolati di ASFV altamente virulenti sono responsabili delle forme peracute e acute mentre gli isolati moderatamente virulenti comportano l'insorgenza di forme acute e subacute.

Gli isolati a bassa virulenza sono presenti principalmente in aree endemiche (nelle quali

possono convivere con ceppi ad alta virulenza) e comportano l'insorgenza di sintomi più lievi talvolta associati a forme subcliniche o croniche. La morbilità dipenderà dal virus isolato e dalla via di esposizione (FAO et al., 2017).

Generalmente la PSA è contraddistinta da morte improvvisa dei suini colpiti, senza distinzione di sesso o di età. La diffusione del virus all'interno della mandria può variare notevolmente nel corso di diverse settimane a seconda del tipo di produzione suinicola, del management dell'allevamento e delle misure di biosicurezza adottate. Sebbene la patologia sia altamente letale, è meno contagiosa di altre a diffusione transfrontaliera, come l'afta epizootica.

Il tasso di mortalità della PSA dipende dalla virulenza dell'isolato: si riscontra un tasso di mortalità dell'100% nelle infezioni da virus altamente virulenti, scende al 20% nei soggetti che presentano forme croniche. In questi casi il rischio di morte coinvolge principalmente le scrofe gravide e i suinetti, spesso indeboliti da patologie concomitanti.

Il tasso di sopravvivenza dei suini ai ceppi altamente virulenti osservato in alcune aree endemiche può essere maggiore di ciò che si crederebbe grazie all'adattamento degli animali al virus. (FAO et al., 2017)

Il periodo di incubazione nelle infezioni naturali è compreso tra i 4 e i 19 giorni. I decorsi clinici della malattia si evidenziano in meno di 7 giorni dall'infezione nelle forme acute, impiegano diverse settimane o mesi nelle forme croniche. (FAO et al., 2017)

FORMA PERACUTA

È una forma dovuta alla presenza di ceppi ad alta virulenza. È caratterizzata da un decorso clinico molto rapido con febbre alta (T superiore a 42° C), anoressia, letargia, talvolta morte improvvisa senza segni di malattia. Questo quadro si osserva per lo più quando il virus penetra in un allevamento indenne e causa la morte di vari animali prima dell'esplosione delle altre forme cliniche. Alcuni soggetti possono mostrare difficoltà respiratoria a causa della febbre alta ma non è possibile riscontrare lesioni macroscopiche nel corso della necropsia. (Salguero, 2020)

FORMA ACUTA

È una forma causata dall'infezione da parte di isolati ad alta o moderata virulenza. È il quadro che si osserva maggiormente negli allevamenti inizialmente indenni subito dopo la notifica dei casi di morte improvvisa (dovute alle forme peracute). Dopo un periodo di incubazione di 4-7

giorni (di rado più di 14) gli animali affetti da forma acuta mostrano i primi sintomi. (FAO et al., 2017)

Il decorso clinico è caratterizzato da febbre alta (40°-42°), letargia, anoressia e inattività (Figura 2 A). Gli animali colpiti tendono a raggrupparsi gli uni agli altri.

Molti dei soggetti infetti mostrano una cianosi centripeta facilmente visibile a livello delle orecchie (Figura 2B), del muso (Figura 2C), degli arti (Figura 2D), dell'addome, della coda e dell'area perineale. (Salguero, 2020) Negli animali colpiti da ceppi ad alta virulenza si osserva spesso distress respiratorio con grave edema polmonare. (Carrasco et al., 2002; Sierra et al., 1990)

I suini infetti possono mostrare uno o più dei seguenti segni clinici in percentuale variabile.

Sono frequentemente riscontrate lesioni cutanee con emorragie petecchiali o ecchimosi più o meno estese (Figura 2E) su orecchie, addome, arti posteriori. Può essere dichiarata la presenza di secrezioni oculari e nasali e talvolta epistassi, vomito, stitichezza o al contrario diarrea che può progredire da mucoide ad emorragica con melena, (Gómez-Villamandos JC et al., 2003; Moulton & Coggins, 1968; Sánchez-Vizcaíno et al., 2015) e visibile grazie al rilevamento di macchie nerastre da feci sanguinolente nella zona perineale. (Figura 2F)

Possono presentarsi casi di aborto nelle scrofe gravide. La mortalità può rasentare il 100% negli allevamenti colpiti entro 7 giorni dalla comparsa della malattia. (Salguero, 2020) Se l'infezione è causata da ceppi altamente virulenti la morte dei soggetti può avvenire in 6-9 giorni post infezione, se invece gli isolati presentano una virulenza moderata si può verificare tra gli 11 e i 15 giorni post infezione.

All'esame necroscopico la lesione più comune che contraddistingue la forma acuta è la splenomegalia emorragica (Carrasco, Bautista, et al., 1997; Konno et al., 1982; Salguero et al., 2002): la milza presenta una colorazione molto scura, una consistenza friabile, i margini sono arrotondati e lo spazio occupato dall'organo in cavità addominale è maggiore rispetto alla norma. La seconda lesione ricorrente è una linfadenite emorragica multifocale: i linfonodi possono presentare emorragie multifocali o diffuse, con aspetto marmorizzato.

I linfonodi maggiormente interessati sono il linfonodo gastroepatico, il renale e altri linfonodi localizzati in sede addominale, tra cui l'ileocecale e il mesenterico. È possibile riscontrare con minore frequenza emorragie nei linfonodi sottomandibolari, retrofaringei o inguinali.

Si possono notare lesioni petecchiali sulla capsula renale e nell'organo in sezione oltre che sulla cistifellea. Si può riscontrare la presenza di emorragie e petecchie a livello della mucosa o della

sierosa di altri organi come l'epicardio, la vescica urinaria, lo stomaco, l'intestino tenue o crasso, in questi ultimi si può rinvenire anche un eccesso di sangue coagulato. (Bautista et al., 1998; FAO et al., 2017; Gómez-Villamandos, Hervás, Méndez, et al., 1995a; C. A. Mebus & Dardiri, 1981; Moulton & Coggins, 1968; Sánchez-Vizcaíno et al., 2015)

Si può osservare un certo accumulo di liquidi a livello cardiaco con idropericardio, a livello addominale con quadri di ascite o a livello toracico con idrotorace.

I polmoni possono apparire congesti e con petecchie, con schiuma che fuoriesce da trachea e bronchi e con grave edema polmonare, alveolare o interstiziale. Si può individuare una congestione a livello epatico. (FAO et al., 2017)

Le forme acute possono essere facilmente confuse con altre patologie, tra cui Peste Suina Classica, Mal Rossino, setticemie da Salmonella e da altri patogeni, oltre che casi di avvelenamenti, come riportato successivamente.

FORMA SUBACUTA

È la forma clinica più rappresentata nei casi di infezione da ASFV a moderata virulenza. I segni clinici sono simili a quelli osservati nella forma acuta sebbene risultino essere meno marcati. (Sánchez-Vizcaíno et al., 2015)

I suini colpiti presentano febbre da moderata ad alta e i tassi di mortalità oscillano tra il 30% e il 70%, con morte dei suini affetti in 7-20 giorni dall'infezione. (Sánchez-Vizcaíno et al., 2015)

I suini sopravvissuti possono rimettersi in un mese. (FAO et al., 2017)

Le alterazioni vascolari sono soprattutto emorragie ed edemi e in questa forma clinica possono risultare anche più intense di quelle manifestate nella forma acuta. (Gomez-Villamandos et al., 1995; Gómez-Villamandos JC et al., 2003)

I sintomi più comuni includono una febbre fluttuante, depressione del sensorio e perdita di appetito. Si evidenzia dolore da parte dell'animale nella deambulazione poiché le articolazioni sono edematose, con accumulo di liquidi e fibrina. Possono esserci segni di fatica anche nella respirazione come eventuale conseguenza di polmonite. Anche in questa forma può insorgere aborto nelle scrofe gravide. (FAO et al., 2017)

La morte dei soggetti colpiti può avvenire in due momenti differenti:

- a seguito di un'iniziale trombocitopenia e leucopenia (Gómez-Villamandos et al., 1998; Villeda et al., 1993a)
- durante una fase di "recupero", evidenziata per lo più nei soggetti giovani, che causa eritrodiapedesi indotta dalla vasodilatazione. (Gómez-Villamandos et al., 1998, 2013)

Alla necropsia gli animali presentano idropericardio (Figura 2G), ascite (Figura 2H), edema multifocale in particolare nella parete della cistifellea o nel grasso perineale. (Sánchez-Vizcaíno et al., 2015) Alcuni soggetti possono mostrare splenomegalia emorragica come nella forma acuta ma nella maggior parte dei casi la splenomegalia è parziale, con porzioni della milza che risultano colpite e altre no. Si può osservare una linfadenite emorragica multifocale che coinvolge più linfonodi in tutte le aree del corpo, che appaiono emorragici e presentano un aspetto "marmorizzato". (Gómez-Villamandos JC et al., 2003)

È possibile il riscontro di emorragie petecchiali anche nel rene. (Gómez-Villamandos, Hervás, Méndez, et al., 1995a; Hervás et al., 1996) Si possono rinvenire i segni di una polmonite multifocale caratterizzata dalla presenza di aree di consolidamento e da una colorazione scura del polmone. Queste lesioni potrebbero dipendere da infezioni secondarie che si instaurano nel soggetto che è già defedato a causa di uno stato di immunosoppressione indotto dal virus. (Gómez-Villamandos JC et al., 2003; Moulton JE et al., 1975; Salguero et al., 2005)



Figura 2, Salguero et al. 2020, Comparative Pathology and Pathogenesis of African Swine Fever Infection in Swine. *Frontiers in veterinary science*, 7, 282

(A) Animale letargico affetto da PSA acuta. L'animale presenta cianosi alle orecchie, all'addome e agli arti. (B) Grave cianosi in un animale affetto da PSA acuta, associata a ipertermia molto elevata (41–42°C). (C) Cianosi del muso e delle labbra nella PSA acuta. (D) Cianosi degli arti nella PSA acuta. (E) Petecchie multifocali ed ecchimosi della pelle nella PSA acuta. (F) Area perianale macchiata di sangue in un suino affetto da PSA subacuta. (G) Idropericardio grave (freccia) nella PSA subacuta. (H) Ascite da moderata a grave (freccia) nella PSA subacuta

FORMA CRONICA

È una forma clinica causata dall'infezione da parte di ceppi di ASFV a bassa virulenza.

È stata osservata di rado in casi riportati per lo più nella Penisola Iberica e nella Repubblica Dominicana. (Gómez-Villamandos et al., 2013; Villeda et al., 1993b)

Attraverso alcuni studi si è giunti alla conclusione che gli isolati a bassa virulenza derivino da virus naturalmente attenuati o si siano evoluti dagli isolati di ASFV utilizzati nei primi studi sui vaccini di campo condotti nella penisola Iberica negli anni '60. (Sánchez-Vizcaíno et al., 2015)

Si può constatare che l'evoluzione degli isolati ad alta o moderata virulenza in altre aree in cui il virus è presente da lunghi periodi non abbia prodotto questa forma clinica della patologia. (Giammarioli et al., 2011; Sánchez-Vizcaíno et al., 2015)

La forma cronica determina dei tassi di mortalità inferiori al 30%.

I segni clinici compaiono tra i 14 e i 21 giorni dopo l'infezione e comprendono una leggera febbre seguita da gonfiore articolare e artrite da moderata a grave. Spesso questi sintomi possono essere associati al rilevamento di arrossamenti su aree cutanee che appaiono anche sopraelevate e necrotiche. (FAO et al., 2017) Si può riscontrare anche ritardo della crescita,

emaciazione, distress respiratorio e aborto. (Arias ML et al., 1986; Sanchez-Botija C., 1982)

In questa forma non si osservano alterazioni vascolari e, come nella forma precedente, molte delle lesioni osservate sono dovute ad infezioni batteriche secondarie che inducono la comparsa di polisierosite fibrinosa, polmonite necrotico caseosa con possibili mineralizzazioni focali (FAO et al., 2017) o a carattere cronico, necrosi della pelle, della lingua e delle tonsille, (Arias ML et al., 1986; Moulton & Coggins, 1968; Sánchez-Vizcaíno et al., 2015) pericardite fibrinosa. I linfonodi si presentano edematosi e parzialmente emorragici (soprattutto i linfonodi mediastinici). (FAO et al., 2017)

PATOGENESI DELLA DEPLEZIONE LINFOIDE

La PSA è associata a grave leucopenia, per lo più connessa a linfopenia, inquadrata in uno stato generale di immunodeficienza del soggetto. (Salguero et al., 2005; Sanchez-Vizcaino JM et al., 1981) Inizialmente il virus penetra nell'ospite suino per via ora-nasale o attraverso il morso di una zecca molle infetta. Il virus replica primariamente nelle tonsille o nei linfonodi regionali (Blome et al., 2013; Greig, 1972) ad esse associate, diffondendosi attraverso la linfa e il sangue agli organi che sono le sedi secondarie di replicazione. Questo iter avviene entro 2-3 giorni dall'infezione, ASFV diffonde successivamente nel resto degli organi, replicando all'interno di cellule differenti. (Gómez-Villamandos et al., 2013; Heuschele, 1967)

Le cellule target della replicazione virale sono i monociti e macrofagi. (Carrasco et al., 2002; Gómez-Villamandos JC et al., 2003; Salguero et al., 2002) La replicazione avviene all'interno del citoplasma (Alcamí et al., 1990; MARTINS et al., 1987): il monocita/macrofago appare rigonfio, con marginalizzazione della cromatina nucleare, mostra un corpo incluso intracitoplasmatico iuxtannucleare, identificabile dalla colorazione pallida che assume quando le sue sezioni semisottili (1-micron) sono evidenziate con colorante blu di toluidina.

I corpi inclusi osservati al microscopio elettronico mostrano al loro interno le *viral factories*.

La replicazione virale induce necrosi (Sierra et al., 1989) o apoptosi (Ramiro-Ibanez et al., 1996) delle cellule infettate, con rilascio dei virioni neoformati per gemmazione dalla membrana cellulare. Il genoma virale contiene dei geni coinvolti nella morte cellulare non programmata che consentono sia la sua inibizione che induzione. (Blome et al., 2013; Brun et al., 1996; Netherton, Connell, et al., 2019) Alcuni di questi geni possono anche promuovere la sopravvivenza delle cellule infette, l'apoptosi sembra essere la modalità meno frequente di

morte cellulare per monociti/macrofagi infetti. (Gomez-Villamandos et al., 1995; Salguero et al., 2004, 2005) I virioni rilasciati dalle cellule in cui è avvenuta la replicazione possono essere osservati liberi nel sangue, nella linfa e nei tessuti interstiziali. (Carrasco et al., 1996; Gómez-Villamandos et al., 1997; Sierra et al., 1987)

La PSA è caratterizzata da una massiva distruzione degli organi e dei tessuti linfoidei tra cui milza, linfonodi, timo e tonsille. (Fernández de Marco et al., 2007; Salguero et al., 2004, 2005)

Vi è una grande percentuale di linfociti B, linfociti T e macrofagi che vanno incontro a morte cellulare nelle forme acute dell'infezione. (Fernández de Marco et al., 2007; C. A. Oura et al., 1998; Salguero et al., 2004, 2005)

La replicazione virale all'interno di queste cellule induce un'attivazione di queste popolazioni. Nelle fasi iniziali della malattia è stato riscontrato un aumento nella secrezione di citochine pro-infiammatorie (Carrasco et al., 2002; Salguero et al., 2002, 2005) come IL-1, TNF- α e IL-6. Questo evento è descritto come "tempesta di citochine" (Gómez del Moral et al., 1999) ed è il meccanismo responsabile dell'induzione dell'apoptosi nei linfociti che si trovano in prossimità dei monociti/macrofagi attivati e infetti nei tessuti. (Salguero et al., 2005)

PATOGENESI DELLE ALTERAZIONI VASCOLARI

La PSA può essere considerata una febbre emorragica con alcuni meccanismi patogenetici simili a quelli descritti nelle febbri emorragiche che colpiscono l'uomo, come l'infezione da Ebola o la malattia da virus di Malburg. (Smither et al., 2013, 2015)

Tra le alterazioni vascolari di maggiore riscontro nelle forme acute di ASF possiamo includere le emorragie petecchiali ed ecchimosi in più organi, splenomegalia emorragica o iperemica, edema polmonare, coagulopatia intravascolare disseminata (CID).

Nelle forme subacute possiamo osservare le stesse alterazioni vascolari che si accompagnano ad un edema più marcato, ascite e idropericardio.

La lesione più frequente e tipica è la splenomegalia emorragica o iperemica (Konno et al., 1982; C. A. Mebus & Dardiri, 1981) la cui gravità dipende dalla virulenza dell'isolato responsabile.

Dal punto di vista istopatologico la milza presenta una polpa rossa iperemica che può essere completamente infarcita da eritrociti, con trombi piastrinici e detriti cellulari, comportando una distruzione della normale architettura splenica. (Carrasco, Bautista, et al., 1997; Salguero et al., 2005)

La polpa rossa splenica del suino ha una struttura caratteristica contenente una rete di fibre e cellule muscolari lisce circondate da una popolazione di macrofagi fissati nei cordoni splenici. (Carrasco et al., 1995) A seguito della necrosi dei macrofagi colpiti dal virus nella polpa rossa, si osserva la perdita delle giunzioni intracellulari tra le cellule muscolari lisce e la lamina basale. Ciò comporta l'attivazione della cascata della coagulazione, l'aggregazione piastrinica e la deposizione di fibrina, dando origine ad un accumulo di eritrociti all'interno dei cordoni splenici. (Gómez-Villamandos et al., 1996, 2013)

Le emorragie sono tipiche delle fasi tardive della malattia soprattutto negli organi sprovvisti di una popolazione di macrofagi vascolari fissi come i linfonodi renali, i linfonodi gastroepatici e il rene. (Gómez-Villamandos et al., 2013)

Nonostante la capacità di ASFV di replicare all'interno delle cellule endoteliali questo fenomeno non è stato osservato in tutti gli organi che presentano emorragie.

La replicazione del virus è stata segnalata all'interno delle cellule epiteliali solo nelle ultime fasi della malattia mentre le emorragie si verificano nelle fasi precedenti. (Carrasco, Chacón-m de Lara, et al., 1997; Gómez-Villamandos, Hervás, Méndez, et al., 1995b)

È stato proposto un meccanismo patogenetico differente alla base della comparsa di emorragie nelle fasi iniziali della malattia: l'attivazione fagocitaria delle cellule endoteliali dei capillari seguita da un'ipertrofia delle cellule endoteliali stesse può portare ad un'occlusione totale del lume del capillare e ad un grave aumento della pressione intravascolare. (Gómez-Villamandos et al., 2013) Ne consegue una perdita delle cellule endoteliali capillari con esposizione della membrana basale alla quale possono aderire le piastrine, determinando un'attivazione del sistema di coagulazione e portando a CID. (Gómez-Villamandos et al., 2013; Villeda et al., 1993b)

Nelle forme subacute di PSA è possibile notare un'intensa trombocitopenia transitoria dovuta ad un aumento di frequenza e di gravità delle emorragie che si instaurano. (Villeda et al., 1993b, 1993a) Questo evento potrebbe rivestire un ruolo fondamentale nello sviluppo di emorragie negli stati intermedi della malattia. Può essere inoltre associato a cambiamenti strutturali dei megacariociti nel midollo osseo tra cui un aumento della presenza di megacariociti con nuclei nudi (Bautista et al., 1998), caratteristica osservata anche nei casi di Peste Suina Classica. (Gómez-Villamandos et al., 2003)

La patogenesi dell'edema inizia con un'infezione grave a carico dei macrofagi intravascolari polmonari (PIMs) che sono i principali bersagli di ASFV nel polmone (Carrasco et al., 1996).

Tutti i macrofagi, infetti e non infetti, mostrano un aumento di volume e segni di attivazione secretoria. La produzione di citochine pro-infiammatorie come IL-1 α e TNF- α promuove un'attività chemotattica e aumenta la permeabilità endoteliale portando ad una fuoriuscita dei fluidi nei setti intralveolari e negli spazi alveolari. (Carrasco et al., 2002)

La marcata anoressia comporta una riduzione della quota proteica introdotta con l'alimento e aggrava una condizione di edema di natura ipo-oncotica che induce al consumo di grasso corporeo, ascite, idrotorace e idropericardio, comuni nelle forme subacute di PSA.

Il fegato è marcatamente congesto con lesioni istopatologiche frequenti, con presenza di inclusi infiammatori multifocali negli spazi periportal, infezione a carico delle cellule del Kupffer, con un'intensa attivazione secretoria e infezione degli epatociti negli stadi avanzati della malattia (Gómez-Villamandos, Hervás, Mendéz, et al., 1995; Konno et al., 1971; Salguero et al., 2008; Sánchez-Cordón et al., 2008; Sierra et al., 1987). Anche la disfunzione epatica può contribuire allo sviluppo di edema multifocale.

CINGHIALI EURO ASIATICI

Il cinghiale euroasiatico (*Sus scrofa*) costituisce una specie nativa originaria di Europa, Asia e Africa settentrionale ma è stato introdotto anche in altri continenti oltre che nelle isole.

È considerato l'antenato naturale del suino domestico ed entrambi appartengono alla stessa specie. Ad oggi i cinghiali costituiscono un elemento cardine nella diffusione dell'infezione da ASFV in Europa e Asia, sono considerati la fonte di infezione principale nelle recenti epidemie in Europa centrale e orientale. (Cadenas-Fernández et al., 2019; Sánchez-Cordón et al., 2019)

Dal punto di vista tassonomico i cinghiali euroasiatici e i suini domestici presentano una stretta relazione e da ciò consegue che si possano osservare molte somiglianze nella risposta immunitaria alla stessa infezione. Nonostante appartengano alla stessa specie (*Sus scrofa*) suini e cinghiali sono collocati in sottospecie differenti (Sánchez-Cordón et al., 2019). Tra i due gruppi sussiste anche una differenza nella gestione e nel controllo della popolazione animale da parte dell'uomo. Queste differenze riguardano la gestione dello stato di salute dei capi animali, la gestione della riproduzione e della nutrizione, con una maggiore attenzione al comparto dell'allevamento rispetto al selvatico. I cinghiali allo stato brado sono soggetti per lo più a

variazioni naturali che intervengono sul loro stato sanitario, riproduttivo e di salute. (Sánchez-Cordón et al., 2019)

Prima dell'epidemia di PSA del 2007 in Georgia erano già stati condotti diversi studi sulla patologia e la patogenesi dell'infezione nei cinghiali, sia in vivo che in condizioni sperimentali. (Sánchez-Cordón et al., 2019) Non erano state individuate differenze significative nella presentazione clinica, nelle lesioni e nel decorso della PSA nei cinghiali rispetto al suino domestico. (L. K. Dixon et al., 2019; Pérez et al., 1998; Sánchez-Cordón et al., 2018; Sánchez-Vizcaíno et al., 2015)

L'interesse scientifico nei confronti di questi studi è aumentato dopo il 2017 a seguito delle numerose segnalazioni di focolai di PSA tra i cinghiali. (L. Li et al., 2019; Rahimi et al., 2010)

Gli studi hanno analizzato la risposta clinica dei cinghiali in diversi contesti e condizioni, sottoponendoli a infezioni da virus a diversa virulenza. Si evince che gli isolati altamente patogeni appartenenti al genotipo II (Bastos et al., 2003) inducono splenomegalia iperemica o emorragica, linfadenite emorragica, edema polmonare ed emorragie petecchiali multifocali (Blome et al., 2012, 2013; Pikalo et al., 2019) talvolta di gravità maggiore rispetto a quelle riportate nei suini domestici (Sánchez-Cordón et al., 2019). Le lesioni emorragiche generalmente sono poco visibili sui cinghiali a causa della colorazione più scura di cute e setole (FAO et al., 2017). La mortalità risulta abbastanza alta (90-100%) anche tra i cinghiali infetti. Occorre puntualizzare che alcune delle varianti che circolano in Europa sono meno virulente rispetto a queste appartenenti al genotipo II Georgia. (C. et al., 2018; Nurmoja, Petrov, et al., 2017)

I cinghiali infettati con virus a bassa virulenza e sopravvissuti possono comunque essere fonte di contagio per alcuni mesi dopo l'infezione per i suini sensibili, sebbene gli attuali isolati non emoadsorbenti del genotipo II non inducano lo stato di portatore a lungo termine. (Pikalo et al., 2019)

FACOCERI E POTAMOCERI

In Africa orientale la PSA risiede all'interno di un antico ciclo selvatico che coinvolge il facocero comune (*Phacochoerus africanus*) e la zecca molle (*Ornithodoros moubata*). (L. K. Dixon et al., 2019; Netherton, Connell, et al., 2019)

I primi studi hanno subito dimostrato un'altissima resistenza da parte del facocero all'infezione (Eustace Montgomery, 1921; Heuschele WP & Coggins L., 1969). I facoceri non presentano segni clinici di malattia ma i soggetti molto giovani possono essere colpiti da uno stato di viremia transitoria. (Jori & Bastos, 2009; Thomson GR, 1985) Nei soggetti adulti la viremia è davvero rara e il virus è per lo più relegato ai linfonodi. (Netherton, Connell, et al., 2019)

Il virus nella sua forma infettiva può persistere nei tessuti del facocero fino a 25 settimane post infezione, ma viene eliminato entro 56 settimane (Anderson et al., 1998), ciò spiegherebbe la possibile reinfezione dello stesso soggetto con il medesimo ceppo virale, se nuovamente punto da una zecca. (Netherton, Connell, et al., 2019)

Da un punto di vista genetico esistono varie differenze tra suini domestici e facoceri che possono giustificare questa diversità (Netherton, Connell, et al., 2019). Una delle possibili differenze nella tolleranza all'infezione e lo sviluppo di sintomi più gravi può essere la presenza di una variante polimorfica RELA (p65; v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A) individuata nei facoceri. (Palgrave et al., 2011)

ASFV è stato isolato anche nei potamoceri (*Potamochoerus larvatus*) e nei maiali rossi del fiume (*Potamochoerus porcus*) specie di suini selvatici dell'Africa sub-sahariana occidentale e centrale (Jori et al., 2013; Jori & Bastos, 2009; Netherton, Connell, et al., 2019; Parkhouse et al., 1998). Anche in questi soggetti ASFV non induce segni clinici ma ci può essere una viremia moderata (Anderson et al., 1998; Parkhouse et al., 1998). Il virus può replicare nei tessuti senza causare lesioni istologiche o comunque causandole solo nelle regioni popolate da linfociti B all'interno dei linfonodi (Netherton, Connell, et al., 2019). I soggetti infetti possono trasmettere il virus attraverso il morso di una zecca o con contatto diretto con i suini domestici sebbene il loro ruolo dal punto di vista epidemiologico non sia chiaro, dal momento che non vivono in tane in cui si annidano le zecche, come i facoceri, e non sono potenzialmente in contatto con le zecche in altri ambienti. (Netherton, Connell, et al., 2019)

COMPARAZIONE CON ALTRI PATOGENI

La Peste Suina Africana si può presentare clinicamente con un ventaglio di sintomi così ampio che spesso la diagnosi clinica può essere molto complessa soprattutto nelle fasi iniziali della malattia o quando i soggetti colpiti sono pochi. La diagnosi clinica può essere spesso speculativa poiché i sintomi possono essere facilmente confusi con altri comuni ad altre patologie/condizioni. Sono numerose le patologie del comparto suinicolo che possono

provocare una mortalità pari a quella osservata in un'epidemia acuta di PSA. Nessuna diagnosi è considerabile definitiva fino a che non si giunge ad una conferma in laboratorio.

È possibile distinguere la PSA da patologie specifiche, da condizioni generali che comportano l'insorgenza di setticemie o da altre cause che comportano la presenza di emorragiche cutanee. (Sánchez-Vizcaíno et al., 2015)

PESTE SUINA CLASSICA (CSF)

La diagnosi differenziale più significativa è quella tra Peste Suina Africana e Peste Suina Classica. La Peste Suina Classica è una patologia causata da un virus (CSFV) appartenente al genere *Pestivirus*, famiglia *Flaviviridae*. È una delle patologie più importanti che interessano i suini domestici e i cinghiali, con un impatto tremendo sulla salute animale e sull'industria suinicola; è una malattia inserita nella lista delle patologie infettive notificabili all'OIE. (Blome et al., 2017)

Nonostante sia stata eradicata nella maggior parte del mondo la PSC mantiene un'incidenza sporadica in aree in cui si ha un'intensa produzione suinicola. Nella maggior parte dei paesi esiste un piano di sorveglianza e controllo per la patologia. Risulta fondamentale ottenere una diagnosi tempestiva e affidabile di PSC per poter eliminare gli allevamenti infetti, delineare le zone di restrizione, attuare le misure di limitazione alla movimentazione dei capi e avviare il tracciamento dei possibili contatti. Nei confronti della patologia sono vietati le vaccinazioni a scopo di profilassi e altri trattamenti ma in Europa la situazione è più complessa. In queste aree la popolazione di cinghiali costituisce un importante serbatoio per la permanenza del virus comportando un rischio di reintroduzione della patologia anche tra i suini domestici. E' stato necessario introdurre la possibilità di una vaccinazione di emergenza sui cinghiali per controllare la diffusione virale. (Blome et al., 2017)

Esistono diverse presentazioni cliniche della patologia, come per la PSA.

La forma acuta della PSC presenta gli stessi aspetti clinici e le stesse lesioni necroscopiche rilevabili nella forma acuta di PSA, con alti livelli di mortalità. (FAO et al., 2017) I segni clinici includono febbre alta, inappetenza, depressione, emorragie (che coinvolgono cute, reni, tonsille e cistifellea), congiuntivite, segni respiratori, debolezza, tendenza al rannicchiamento, colorazione violacea della cute e morte che può avvenire tra i 2 e i 10 giorni post infezione.

L'unico strumento che consente di distinguere tra le due pesti è un esame di laboratorio.

Sarebbe opportuno non somministrare un vaccino nei confronti di PSC finché non si possiede

una conferma della diagnosi perché ASFV potrebbe essere facilmente diffuso anche da personale non ben istruito nel corso del piano di vaccinazione. (FAO et al., 2017)

PORCINE REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY SYNDROME (PRRS)

La PRRS è una patologia nota anche come malattia delle orecchie blu.

L'agente eziologico è un virus (PRRSV) a RNA, appartenente alla famiglia *Arteriviridae*.

Una delle caratteristiche più importanti del virus è l'ampia gamma di segni clinici che si possono verificare, alcuni soggetti si presentano asintomatici, altri sono colpiti da sintomi gravissimi nel caso di infezioni da ceppi di PRRSV ad alta virulenza. (Ruedas-Torres et al., 2021)

La PRRS è una malattia caratterizzata dall'insorgenza di polmonite che compare nei soggetti in accrescimento e in finissaggio, può provocare anche aborto nelle scrofe gravide. La sintomatologia nelle infezioni da ceppi ad alta virulenza comprende febbre e a volte diarrea, quasi sempre arrossamento della cute, si può notare in particolare una colorazione bluastra della cute delle orecchie. Sebbene il tasso di mortalità nei soggetti colpiti non sia generalmente elevato, i virus PRRS ad alta patogenicità hanno decimato negli ultimi anni allevamenti suini in Cina, Vietnam ed Europa orientale. I sintomi presentati dagli animali coinvolti in questi focolai erano: febbre alta, letargia, anoressia, tosse, perdita di peso, dispnea, zoppia e cianosi evidenziabile a livello delle orecchie, degli arti e del perineo.

I riscontri necroscopici includono lesioni a carico dei polmoni (polmonite interstiziale) e degli organi linfoidi (atrofia del timo e linfonodi emorragici ed edematosi), oltre ad emorragie petecchiali a carico dei reni. (Sánchez-Vizcaíno et al., 2015)

PORCINE DERMATITIS AND NEPHROPATHY SYNDROME (PDNS)

La PDNS è una malattia associata al circovirus-2 suino (PCVAD) che colpisce di solito i soggetti in accrescimento e in finissaggio. Malgrado i segni clinici della patologia siano patognomonici non esiste un test diagnostico specifico per identificarla.

La sindrome è caratterizzata dal riscontro di lesioni cutanee di colore rosso scuro/violacee, spesso più prominenti sui quarti posteriori e nella zona perineale, sebbene possano arrivare a colpire anche i fianchi nei casi più gravi. Le lesioni a carico delle pareti dei vasi sanguigni sono causate da una vasculite necrotizzante e sono facilmente distinguibili microscopicamente dalle lesioni vascolari causate da ASFV.

La malattia accompagnata da sintomi quali anoressia, depressione e grave nefrosi che normalmente costituisce la causa di decesso. È possibile riscontrare un aumento di volume dei linfonodi. La morbilità è generalmente bassa ma i soggetti colpiti spesso giungono a morte. (FAO et al., 2017)

MAL ROSSINO (ERYSIPELOTHRIX RHUSIOPATHIAE)

È una patologia infettiva causata da *Erysipelothrix rhusiopathiae*, un bacillo Gram+ di piccole dimensioni, ubiquitario, immobile, non sporigeno, acido resistente, capace di causare malattia in vari esseri viventi, tra cui tacchini, polli, uccelli, pecore, pesci, rettili ma soprattutto suini e l'uomo. L'infezione nell'uomo è correlata al lavoro e si manifesta in tre forme: una forma lesionale cutanea localizzata, una forma cutanea generalizzata e una forma setticemica che di solito è connessa ad endocardite.

Nell'ambito suinicolo questa patologia presenta una notevole importanza dal punto di vista economico anche se spesso viene sottodiagnosticata. (Q. Wang et al., 2010)

Il Mal rossino colpisce i suini di tutte le fasce di età sia all'interno degli allevamenti intensivi che degli allevamenti estensivi o su piccola scala.

I sintomi possono insorgere in forma acuta o subacuta. La forma acuta, generalmente riscontrata nei soggetti più giovani, è caratterizzata da morte improvvisa sebbene la mortalità sia di norma inferiore a quella provocata dalla forma acuta di PSA.

Dopo due o tre giorni dall'infezione i suini colpiti possono presentare le caratteristiche e patognomiche lesioni cutanee a forma di diamante associate ad una vasculite necrotizzante. Nei soggetti adulti questa costituisce normalmente l'unica manifestazione clinica della malattia.

Tra i riscontri necroscopici si ha splenomegalia e congestione della milza.

Si può riscontrare congestione anche a carico dei polmoni e dei linfonodi periferici così come emorragie nella zona corticale del rene, nel cuore e nella sierosa dello stomaco.

Le alterazioni microscopiche differiscono da quelle indotte da ASFV.

L'isolamento batterico costituisce una conferma diagnostica in base alla quale si può iniziare il trattamento antibiotico con penicillina, a cui i suini di norma rispondono in maniera positiva. (FAO et al., 2017)

MALATTIA DI AUJESZKY (PRV)

La malattia di Aujeszky, anche nota come pseudorabbia, è una malattia virale altamente contagiosa causata dal virus della pseudorabbia (PRV). La malattia, emersa circa 200 anni fa, può colpire anche essere umani e altri mammiferi tra cui suini, pecore, cani, conigli, roditori, bovini e gatti. L'unico ospite naturale del virus è il suino. (H.-H. Zheng et al., 2022)

La pseudorabbia provoca gravi danni neurologici e riproduttivi che possono condurre alla morte i soggetti che ne sono affetti. Gli individui più giovani sono colpiti in maniera grave con tassi di mortalità che raggiungono il 100% durante le prime due settimane di vita.

I suinetti di solito manifestano febbre, anoressia, segni neurologici (tremori, convulsioni e paralisi) e muoiono spesso entro 24-36 ore dall'infezione. I soggetti in accrescimento possono mostrare sintomi simili ma solitamente presentano segni respiratori e vomito e una probabilità di morte inferiore. Scrofe e cinghiali presentano principalmente segni respiratori ma le scrofe possono anche abortire o partorire suinetti disvitali. (FAO et al., 2017)

Le conseguenze della diffusione del virus sono particolarmente gravi da un punto di vista economico, comportando ingenti perdite nel comparto suinicolo. (H.-H. Zheng et al., 2022)

Le lesioni riscontrate sono di tipo necrotico-focali evidenziabili nel cervello, nel cervelletto, nelle ghiandole surrenali e in altri organi come polmoni, fegato o milza, accompagnate da encefalomielite.

Nei suinetti o nei feti si possono evidenziare macchie bianche epatiche che sono fortemente suggestive dell'infezione. (FAO et al., 2017)

SALMONELLOSI

Di norma le setticemie sono delle forme infettive che colpiscono i soggetti più giovani. Se un animale colpito da setticemia viene trattato in tempi rapidi con antimicrobici è possibile la guarigione.

Salmonella è un patogeno diffuso tra uomini e animali. È un bacillo gram-, asporigeno e anaerobio facoltativo. Tra i numerosi sierotipi di salmonella esistenti (>2000) quelli che causano principalmente malattie cliniche nei suini sono *Salmonella choleraesuis* e *Salmonella typhimurium*.

S. choleraesuis è il sierotipo specifico adattato ai suini e può provocare una malattia grave diffusa nelle scrofe (con febbre, depressione, setticemia, polmonite, meningite, artrite e diarrea) ma di solito non colpisce l'uomo.

La salmonellosi può manifestarsi a qualsiasi età ma è più comune nei suini in crescita con più di 8 settimane di vita. La salmonella presente nell'intestino dei suini può contaminare la carcassa durante la macellazione comportando anche un potenziale rischio per la salute pubblica.

La conferma di diagnosi si ha con la coltura batterica e l'isolamento di Salmonella.

I sintomi della setticemia comprendono: febbre, anoressia, disturbi respiratori o gastrointestinali e le carcasse appaiono congeste e febbrili alla macellazione.

I soggetti colpiti possono morire in 3-4 giorni post infezione, mostrando cianosi a carico delle orecchie, degli arti posteriori, della coda e dell'addome. I reperti necroscopici includono il riscontro di emorragie petecchiali nei reni e sulla superficie cardiaca, splenomegalia (con colorazione normale della milza), aumento di volume dei linfonodi mesenterici, epatomegalia e congestione a carico dei polmoni. (FAO et al., 2017)

PERSISTENZA E RESISTENZA

SUINI DOMESTICI

L'identificazione di potenziali fonti di persistenza e sopravvivenza di ASFV nell'ambiente costituisce un punto cruciale nel controllo della diffusione della patologia così come sottolineato nella review di Mazur-Panasiuk et al. (Mazur-Panasiuk et al., 2019)

La trasmissione del patogeno può avvenire non solo per contatto diretto (tra soggetti infetti/secrezioni e animali suscettibili) o mediato da zecche, ma anche per contatto indiretto da mangime o cibo contaminato, carne di maiale, veicoli, fomite o per trasmissione umana. (Dee, Bauermann, Niederwerder, Singrey, Clement, de Lima, Long, Patterson, Sheahan, Stoian, Petrovan, Jones, De Jong, et al., 2018; Mur, Martínez-López, et al., 2012; "Scientific Opinion on African Swine Fever," 2014)

Nel corso degli anni sono stati eseguiti numerosissimi studi per saggiare la resistenza del virus in svariate condizioni e in svariati mezzi. (Coggins L., 1966; Davies et al., 2017; Dee, Bauermann, Niederwerder, Singrey, Clement, de Lima, Long, Patterson, Sheahan, Stoian, Petrovan, Jones, De Jong, et al., 2018; Kalmar et al., 2018; McKercher et al., 1978; C. Mebus et al., 1997a; C. A. Mebus et al., 1993; Pietschmann et al., 2015; Plowright & Parker, 1967; Turner & Williams, 1999)

È stato dimostrato che ASFV presenta un'alta resistenza nei confronti di varie condizioni ambientali, mantenendo la sua infettività anche a temperature di conservazione inferiori a 0° o a 4°. Nel 1921 Montgomery ha dimostrato che ASFV è estremamente resistente anche alle alte

temperature, alla putrefazione e all'essiccamento. (Eustace Montgomery, 1921) Nel 1966 Coggins ha dimostrato un'alta resistenza del virus anche a trattamenti chimici selezionati (tripsina ed EDTA) e fisici (s/congelamento e ultrasuoni). Viene comprovata anche la resistenza del virus in forma vitale ad un'ora di incubazione a 56° e ad una settimana di incubazione a 37°. (Coggins L., 1966)

Plowright e Parker nel 1967 hanno evidenziato che la conservazione a 4° C mantiene stabile l'infettività del virus all'interno di una matrice di sangue viremico per almeno 75 settimane. ASFV può sopravvivere anche a molti cicli di congelamento-scongelo e si presenta stabile in un intervallo di pH tra 3,9 a 13,4 per sette giorni (in terreni arricchiti con siero). (Plowright & Parker, 1967)

Studi più recenti hanno dimostrato che il virus può sopravvivere a congelamento profondo (-70°) per molti anni senza perdere il suo titolo in maniera importante, ma a -20° C perde parte del titolo iniziale, rimanendo vitale per 105 settimane (2 anni). (Plowright & Parker, 1967)

A 4° C il virus presenta una certa stabilità anche nel terreno, rimanendo contagioso per 61 settimane (1 anno e 2 mesi). A temperature maggiori viene inattivato in tempi più brevi, a 37° C troviamo ancora tracce di virus dopo 22 giorni, a 56° dopo un'ora, ma a 60° C non ci sono più tracce virali dopo 15 minuti.

A causa di questa stabilità ASFV può persistere per diverso tempo all'interno di carne o fomi contaminati; ciò assume un certo rilievo se si pensa al ruolo di questi prodotti come veicoli di trasmissione del virus transfrontaliera o transcontinentale. Basti pensare all'epidemia scatenatasi in Georgia nel 2007 dovuta allo smaltimento improprio di carne suina contaminata proveniente da una nave al molo di Poti. Casi analoghi sono stati individuati come fonte dell'introduzione di ASFV in Portogallo (1957), a Cuba (1971), in Brasile (1978) e in Belgio (1985). (Dee, Bauermann, Niederwerder, Singrey, Clement, de Lima, Long, Patterson, Sheahan, Stoian, Petrovan, Jones, De Jong, et al., 2018; Mur, Martínez-López, et al., 2012)

La trasmissione diretta del virus tra un animale infetto e uno suscettibile è stata verificata attraverso svariati studi. I più recenti hanno dimostrato che il DNA virale si può rintracciare nel sangue (primo riscontro a 3.75+- 1.4 dpi), a livello nasale, rettale, nelle secrezioni orali, nelle feci e nelle urine degli animali infetti. (Blome et al., 2013; Davies et al., 2017; C. Gallardo et al., 2017; Guinat et al., 2014; Olesen, Hansen, et al., 2018; Pikalo et al., 2019; Vlasova et al., 2015)

Le cariche virali più alte nel sangue possono essere registrate tra i 5 e i 27 giorni post infezione dopo inoculazione intramuscolare/intranasale o tra 9 e 29 giorni post infezione se invece il contatto avviene tra suino-suino. I titoli massimi nel sangue variano da 10^6 a 10^9 HAD 50/mL nella fase acuta di infezione. Per quanto concerne le escrezioni e le secrezioni è stato dimostrato che la sopravvivenza del virus in questi mezzi dipende principalmente dalla temperatura. In condizioni favorevoli può persistere per lungo tempo aumentando il rischio di diffusione della patologia, soprattutto nei casi di scarse misure di biosicurezza. (“Scientific Opinion on African Swine Fever,” 2014)

È stato dimostrato che anche solo il contatto aereo (senza contatto fisico tra i soggetti infetto/sano) sia sufficiente a sviluppare malattia in soggetti suscettibili. (de Carvalho Ferreira et al., 2013; Olesen et al., 2017; Wilkinson et al., 1977)

Per quanto concerne le escrezioni fecali sappiamo che il virus rimane vitale al loro interno per almeno 160 giorni. (“Scientific Opinion on African Swine Fever,” 2014b) Secondo studi più recenti questo valore varia con il variare della temperatura: le feci raccolte da suini infettati sperimentalmente sono rimaste infettive per 8 giorni a 4° e 3-4 giorni a 37°. Per quel che riguarda l’urina potrebbe contenere virus vitale fino a 15 giorni a 4°, fino a 5 giorni a 21° e fino a 2-3 giorni a 37°. (Davies et al., 2017)

La dose infettiva di virus per via oronasale è molto piccola, stimata in 101 HAD50/mL, ciò spiega come una piccola quantità di escrezioni possa contaminare anche i fomenti, vestiti, calzature, attrezzature. (Olesen, Lohse, et al., 2018)

Recentemente lo studio condotto da Niederwerder et al. ha determinato che la dose minima infettiva per un suino suscettibile di PSA all’interno del mangime/acqua di bevanda sia di almeno 100 TCID50 all’interno dei liquidi e 104 TCID50 all’interno dei mangimi solidi a base vegetale. Lo studio ha anche messo in luce come una dieta liquida comporti una maggiore probabilità di infezione rispetto ad una dieta a base di mangime essiccato. (Niederwerder et al., 2019)

Storicamente l’introduzione di ASFV in territori indenni è stata attribuita anche al consumo di prodotti a base di suino contaminati. Ad oggi sappiamo che questa modalità di trasmissione può in effetti essere possibile. (Mur, Martínez-López, et al., 2012) Generalmente consideriamo i prodotti a base di carne riscaldati, cotti o in scatola sicuri dal punto di vista della presenza di

patogeni al loro interno, come è stato sperimentalmente dimostrato. (Coggins L., 1966; Plowright & Parker, 1967; Sindryakova et al., 2016)

Numerosi studi hanno fornito dati riguardo alla stabilità di ASFV all'interno di carni crude e lavorate o altri prodotti a base di carne suina. (McKercher et al., 1978) La carne cruda e gli organi di suino congelati garantiscono la vitalità di ASFV per periodi tra i 103 e i 118 giorni.

Nella carne conservata a 4°-8° è possibile rintracciare un virus vitale anche per periodi compresi tra 84 e 155 giorni. ("Scientific Opinion on African Swine Fever," 2014) I campioni di milza suina conservati in frigorifero sono rimasti infettivi per 204 giorni, ma se sotterrati nel terreno a giugno a 8 cm di profondità hanno mantenuto l'infettività per 280 giorni. Il midollo osseo (nella carne disossata) rimane infettivo per 180-188 giorni, la carne e il grasso per 300 giorni, le frattaglie per 105 giorni. Questi ultimi dati risultano purtroppo incompleti a causa della mancata dichiarazione della temperatura alla quale sono stati conservati, che sicuramente avrà influito sulla sopravvivenza del virus. ("Scientific Opinion on African Swine Fever," 2014)

La valutazione della sopravvivenza di ASFV in prodotti che non possono essere trattati termicamente e che vengono conservati tramite processi di salagione o essiccazione è più complessa. ("Scientific Opinion on African Swine Fever," 2014) Gli studi che hanno indagato questa possibilità sono limitati al prosciutto, alla spalla italiana o spagnola, al lombo, al salame, alle salsicce affumicate, alla pancetta e alla carne in scatola.

Salame e salsiccia potrebbero rimanere infetti per più di 30 giorni. (McKercher et al., 1978) Pancetta e lombo contengono ASFV vitale anche tra i 60 e gli 83 giorni, sicuramente un tempo più lungo della durata del processo di stagionatura commerciale di questi stessi prodotti, che sarebbe di 14-21 e di 60 giorni rispettivamente, e compreso nella shelf life del prodotto in vendita. La carne in scatola conservata a 4°-6° C rimane infettiva per almeno 60 giorni (durata dello studio) anche se la durata si è ridotta a 16 giorni quando la temperatura è aumentata raggiungendo quella dell'ambiente. (Plowright & Parker, 1967)

I prosciutti stagionati come il lombo iberico (112 giorni), la spalla (140 giorni) jamon Serrano e il prosciutto di parma (180 e 300-399 giorni) potrebbero rimanere infetti relativamente a lungo ma la durata del processo di stagionatura fa sì che ciò non avvenga, poiché maggiore dei tempi indicati. (C. Mebus et al., 1997; "Scientific Opinion on African Swine Fever," 2014) Risulta quindi evidente come il processo di stagionatura vada ad inattivare il virus e a rendere sicuri i prodotti.

CINGHIALI SELVATICI

Il problema della resistenza e della persistenza del virus riguarda oggi principalmente le carcasse dei cinghiali selvatici che diventano serbatoio di ASFV in tutta Europa. L'eradicazione della malattia risulta estremamente difficile anche perché occorrerebbe rintracciare tutte le carcasse in decomposizione per smaltirle correttamente, riducendo i rischi di trasmissione del virus tramite questa modalità. (Boklund et al., 2018)

La sopravvivenza del virus in varie matrici gioca un ruolo cruciale per la trasmissione indiretta della PSA all'interno di una popolazione di cinghiali (Álvarez et al., 2019) poiché può durare diversi mesi o addirittura anni. I dati riguardanti la resistenza di ASFV negli organi e nei tessuti dei cinghiali quali ossa, muscoli o pelle, sono scarsi. Le prove suggeriscono che i muscoli e pelle/grasso sottocutanei provenienti dai cinghiali rappresentino serbatoi a lungo termine per la PSA infettiva, soprattutto a basse temperature. D'altro canto, la stabilità del virus della PSA nelle urine e nelle feci sembra essere relativamente bassa (Davies et al., 2017; Fischer, Hühr, et al., 2020). La sopravvivenza di ASFV nel terreno sotto ad una carcassa infetta dipende fortemente dal tipo di terreno (sabbia o terreno ricco di humus) con tempi di sopravvivenza che variano da meno di tre giorni fino a due settimane (Carlson et al., 2020; Mazur-Panasiuk & Woźniakowski, 2020) Nell'acqua contaminata, il virus infettivo è stato rilevabile per almeno 14 giorni (Mazur-Panasiuk & Woźniakowski, 2020) mentre è stata osservata una rapida diminuzione dell'infettività sulle colture in campo asciutto (Fischer, Mohnke, et al., 2020).

DIAGNOSI

SUINI DOMESTICI

La diagnostica costituisce uno strumento di controllo essenziale nel riscontro della presenza della patologia e nella valutazione della sua diffusione, così come sottolineato nella review di Hu et al. (Hu et al., 2023) La conoscenza dell'architettura del virus e dei meccanismi molecolari delle proteine virali costituisce una base teorica imprescindibile per la messa a punto di kit diagnostici e di vaccini.

La proteina p72, codificata dal gene B646L, è posizionata sulla superficie del capsido virale e ha la capacità di indurre la produzione di anticorpi neutralizzanti da parte dell'ospite, oltre a partecipare attivamente al processo di adesione del virus alle cellule dell'ospite (Gómez-Puertas et al., 1996).

I geni E183L e CP204L codificano rispettivamente per le proteine p54 e p30, che sono localizzate sull'involucro interno delle particelle virali. La funzionalità della proteina p54 è in linea con quella di p72, entrambe agevolano l'adesione da parte del virus (Rodriguez et al., 1994).

Al contrario p30, che è espressa intensamente soprattutto durante la prima fase dell'infezione, svolge un ruolo cruciale nell'endocitosi del virus (Gómez-Puertas et al., 1998).

Il gene CP2475L codifica invece per la proteina pp220, posizionata sul nucleo centrale della particella virale, che partecipa attivamente all'assemblaggio del nucleo virale (Andrés et al., 1997).

Le proteine Pa104R e p10, codificate da A104R e K78R, sono localizzate all'interno del nucleo e hanno un ruolo chiave nella replicazione virale (Frouco et al., 2017; Nunes-Correia et al., 2008).

La famiglia multigenica MGF (MGF110, MGF300, MGF360, MGF530/505) è associata alla specificità dell'ospite e all'evasione della risposta immunitaria, possiede funzioni differenti, dal determinare la virulenza dell'isolato, a facilitare la replicazione del virus o stabilirne la latenza (Afonso et al., 2004; O'Donnell et al., 2016).

Attualmente le tecniche diagnostiche impiegate per individuare i casi di PSA prevedono l'impiego di test di laboratorio e test rapidi da effettuare in loco. I test di laboratorio offrono notevoli vantaggi tra cui una maggiore sensibilità, una maggiore possibilità di approfondimento e una maggiore efficacia, oltre ad un miglior rapporto qualità/prezzo. Allo stesso tempo necessitano però di strutture specializzate e attrezzature costose, fattori che li rendono più adatti all'utilizzo per allevamenti di grandi dimensioni piuttosto che al monitoraggio di routine nelle aziende di dimensioni inferiori.

L'utilizzo dei test rapidi comporta dei vantaggi poiché possono essere applicati in campo ovviando alla necessità di ricorrere a strutture esterne specializzate. Occorre però considerare che di norma minore è il tempo richiesto dalla reazione che andiamo ad effettuare in campo, minore sarà anche la sensibilità del rilevamento. Questo potrebbe essere, secondo Hu et al. un punto cardine nella direzione della ricerca in futuro. (Hu et al., 2023)

La scelta del campione da prelevare ed analizzare è rilevante ai fini dell'accuratezza dei risultati. Secondo studi più recenti la presenza di ASFV può essere rilevata quotidianamente testando

fluidi orali, campioni provenienti da linfonodi inguinali e da tessuti auricolari, oltre ovviamente ai campioni ematici.

Secondo il capitolo 3.9.1 del WOAH Terrestrial Manual (2021) (WOAH, 2021) le procedure diagnostiche di laboratorio per il rilevamento della PSA sono classificabili in:

- Isolamento del virus: ottenuto tramite inoculazione in colture di leucociti o midollo osseo suino
- Ricerca del DNA virale: attraverso la reazione a catena della polimerasi (PCR).
- Identificazione dell'antigene: tramite test di immunofluorescenza diretta (FAT) su strisci o sezioni di tessuto congelate

Attualmente la PCR è la tecnica più sensibile e può rilevare il DNA del virus anche in una fase molto precoce dell'infezione in campioni di tessuto, sangue con EDTA e siero.

La PCR è particolarmente utile quando i campioni presentati non sono idonei né per l'isolamento del virus né per la ricerca dell'antigene a causa di fenomeni putrefattivi in atto.

I suini guariti da infezioni acute, subacute o croniche in genere presentano viremia per diverse settimane, rendendo il test PCR uno strumento molto utile per la rilevazione del DNA dell'ASFV in animali infettati da ceppi a virulenza bassa o moderata. Grazie alla sua elevata sensibilità e specificità, unitamente alla possibilità di un'applicazione ad alto rendimento, la PCR è un metodo raccomandato per lo screening e la conferma di casi sospetti

L'isolamento del virus mediante inoculazione di colture di leucociti o midollo osseo suino e l'identificazione mediante test di emoadsorbimento (HAD) sono raccomandati come test di conferma quando la PSA risulta positiva ad altri metodi di indagine, in particolare in caso di epidemia iniziale o di un caso isolato di PSA.

Poiché non esiste un vaccino la presenza di anticorpi contro ASFV è un indicatore di una precedente infezione. Gli anticorpi vengono prodotti a partire dalla prima settimana di infezione e persistono a lungo rappresentando un buon marcatore diagnostico per la malattia, soprattutto nelle forme subacute e croniche.

È importante sottolineare che la PSA non è una zoonosi e non colpisce la salute pubblica umana (Sánchez-Vizcaíno et al., 2009). Tuttavia il virus ASFV deve essere manipolato con un livello appropriato di biosicurezza, stabilito tramite un'analisi del rischio e in conformità con il Capitolo

1.1.4 Biosicurezza e bioprotezione: Standard per la gestione del rischio biologico in laboratori veterinari e strutture per animali di WOA. H.

IDENTIFICAZIONE DELL'AGENTE

In caso di sospetta Peste Suina Africana è necessario inviare al laboratorio i seguenti campioni: sangue con anticoagulante (EDTA per PCR, eparina o EDTA per isolamento del virus), siero e tessuti (principalmente milza, linfonodi, midollo osseo, polmone, tonsille e reni).

ISOLAMENTO VIRALE

Si esegue il processo di preparazione del campione a partire da tessuti prelevati dal caso sospetto, si ottiene il surnatante, substrato idoneo per l'isolamento del virus.

TEST DI EMOADSORBIMENTO

Il test di emoadsorbimento (HAD) (de León et al., 2013) si basa sulla proprietà degli eritrociti suini di aderire alla superficie di monociti o macrofagi suini infettati dall'ASFV. La maggior parte degli isolati del virus presentano infatti un fenotipo HAD. Un risultato positivo al test HAD è definitivo per la diagnosi di PSA. È stato isolato un numero limitato di virus "non emoadsorbenti" la maggior parte dei quali attenuati o non virulenti, ma alcuni possono comunque provocare la tipica forma acuta di PSA.

Il test viene eseguito inoculando sospensioni di sangue o tessuto provenienti da suini sospetti in colture primarie di leucociti del sangue di suini sani o in colture di macrofagi alveolari. È essenziale eseguire tutte le procedure in modo tale da prevenire la contaminazione delle colture.

L'emoadsorbimento consiste nell'adesione di un gran numero di eritrociti suini alla superficie delle cellule infette dal virus. Un effetto citopatico (CPE) caratterizzato da una riduzione del numero di cellule adese in assenza di emoadsorbimento può essere dovuto alla citotossicità dell'inoculo, al virus della malattia di Aujeszky o ad un ceppo di ASFV non emoadsorbente. Questi ultimi due casi possono essere distinti mediante test di immunofluorescenza diretta (FAT) sul sedimento cellulare o tramite PCR (come descritto in seguito). Se non si osservano cambiamenti o se i risultati dei test di immunofluorescenza e PCR sono negativi è necessario sottocoltivare il surnatante fino a tre volte in nuove colture di leucociti.

Tutti gli isolamenti virali devono essere confermati con PCR e sequenziamento.

ISOLAMENTO VIRALE NELLE CELLULE DEL MIDOLLO OSSEO SUINO

Nel caso in cui non sia possibile ottenere un quantitativo di sangue suino defibrinato sufficiente ad effettuare il test HAD, le colture di cellule primarie del midollo osseo possono essere utilizzate come sistema alternativo per l'isolamento del virus.

Le cellule infette vengono rilevate tramite la tecnica FAT indiretta. Il vantaggio di questo metodo di rilevamento è che non viene influenzato dal fenotipo HAD del virus. Questo metodo può essere impiegato anche utilizzando colture primarie di leucociti suini o macrofagi alveolari, sostituendo la rilevazione HAD con eritrociti suini con la tecnica FAT.

RICERCA DEGLI ANTIGENI CON TEST FAT

Il test FAT può essere utilizzato come metodo aggiuntivo per rilevare l'antigene virale nei tessuti di suini sospetti in campo o in laboratorio. Un test FAT positivo associato a segni clinici e lesioni appropriate può fornire una diagnosi presuntiva di PSA. Il test FAT può essere impiegato anche per rilevare l'antigene di ASFV in colture di leucociti in cui non si osserva emoadsorbimento consentendo così l'identificazione di ceppi virali non emoadsorbenti. Inoltre permette di distinguere l'effetto citopatico (CPE) prodotto dall'ASFV da quello prodotto da altri virus come il virus della malattia di Aujeszky o un inoculo citotossico.

È importante sottolineare che nella malattia subacuta e cronica questo test presenta una sensibilità significativamente ridotta. Questa riduzione potrebbe essere correlata alla formazione di complessi antigene-anticorpo nei tessuti dei suini infetti, i quali bloccano l'interazione tra l'antigene dell'ASFV e l'anticorpo coniugato utilizzato per la rilevazione.

RICERCA DEL GENOMA VIRALE TRAMITE PCR

Le tecniche PCR sono state sviluppate utilizzando primer provenienti da una regione altamente conservata del genoma per rilevare e identificare un'ampia gamma di isolati appartenenti a tutti i genotipi virali conosciuti, inclusi virus non emoadsorbenti ed isolati a bassa virulenza.

Sono stati descritti numerosi metodi PCR convenzionali e in tempo reale (Agüero et al., 2003; Basto, Portugal, et al., 2006; Fernández-Pinero et al., 2013; D. P. King et al., 2003; Tignon et al., 2011) e sono disponibili diversi kit PCR commerciali per la rilevazione di ASFV. Sono state inoltre descritte tecniche di RT-PCR duplex per il rilevamento simultaneo e differenziale di ASFV e CSFV (Agüero et al., 2004; Haines et al., 2013).

Qualsiasi protocollo PCR utilizzato deve essere validato come idoneo allo scopo prescelto.

Di seguito tre procedure PCR validate da WOAHA (Agüero et al., 2004; Fernández-Pinero et al., 2013; D. P. King et al., 2003) che prevedono una fase di preparazione del campione seguita dal test vero e proprio. Queste procedure fungono da linea guida generale e da punto di partenza per i protocolli PCR.

CONVENTIONAL PCR - È possibile utilizzare diversi campioni per l'analisi PCR come surnatanti di colture cellulari, sangue in provette EDTA, siero e omogeneizzati di tessuti. Il set di primer utilizzato in questa procedura può essere combinato con un set di primer specifico per il virus della Peste Suina Classica (CSFV) in un metodo multiplex RT-PCR che consente il rilevamento simultaneo e differenziale di entrambi i genomi virali in un'unica reazione (Agüero et al., 2004).

REAL TIME PCR procedura 1 approvata da King et al. nel 2003 (D. P. King et al., 2003) e procedura 2, convalidata da Fernández-Pinero et al. nel 2013 (Fernández-Pinero et al., 2013)

Quest'ultimo metodo PCR in tempo reale ha dimostrato di possedere la massima sensibilità per il rilevamento del DNA di ASFV sia nelle fasi iniziali dell'infezione che negli animali cronicamente infetti a lungo termine, in cui il titolo di viremia è solitamente piuttosto basso (Fernández-Pinero et al., 2013; M. C. Gallardo et al., 2015)

RICERCA ANTIGENI ELISA

Il test ELISA per la rilevazione dell'antigene può essere utilizzato come metodo alternativo ma la sua sensibilità è di gran lunga inferiore rispetto al test PCR o al test HAD, di conseguenza non dovrebbe essere impiegato come unico metodo di rilevamento del virus. I risultati ottenuti tramite ELISA devono essere confermati da PCR o HAD.

È disponibile in commercio un kit per l'utilizzo su campioni di sangue, milza o linfonodi suini, da effettuare seguendo le raccomandazioni del produttore. Il kit sfrutta la tecnica ELISA sandwich a doppio anticorpo. Un anticorpo monoclonale (MAb) specifico per la proteina del capsido virale viene legato alla piastra e si lega all'ASFV presente nei campioni positivi. Dopo un lavaggio, viene aggiunto un secondo MAb, anch'esso monoclonale, specifico per un diverso epitopo sulla proteina del capsido e coniugato alla perossidasi. Il legame di questo secondo anticorpo all'antigene catturato viene rilevato mediante l'aggiunta di un substrato appropriato.

TEST SIEROLOGICI

I test sierologici rappresentano i metodi diagnostici più comunemente usati grazie alla loro semplicità, ai costi relativamente bassi e al fatto che richiedano l'utilizzo di poca strumentazione o strutture specializzate. Considerando la mancanza di un vaccino commerciale contro la PSA si può desumere che la presenza di anticorpi anti-ASFV sia sempre indicativa di un'infezione avvenuta. Inoltre gli anticorpi anti-ASFV compaiono poco dopo l'infezione (7-10 giorni) e persistono per diversi mesi o addirittura anni.

I suini domestici e i cinghiali infettati da ceppi virulenti solitamente muoiono prima di sviluppare una risposta immunitaria specifica anticorpale. Nelle aree in cui ASFV è endemico in cui circolano anche isolati virali attenuati e a bassa virulenza la diagnosi sierologica è fondamentale per identificare gli animali guariti e gli animali infetti ma asintomatici.

Il test più utilizzato è il test ELISA (C. Gallardo, Nieto, et al., 2015; Sanchez-Vizcaino, 1987), adatto all'analisi su campioni di siero o plasma. La conferma della positività dei campioni ELISA deve essere effettuata utilizzando un test alternativo come IFAT (Indirect Fluorescent Antibody Test), IPT o immunoblotting (C. Gallardo, Nieto, et al., 2015; Pastor et al., 1989).

I target maggiormente utilizzati nel rilevamento degli anticorpi includono le proteine strutturali p72, p54 e p30, così come le proteine non strutturali pK205R e pB602L con funzioni differenti e diverse tempistiche di comparsa nei vari stadi dell'infezione virale. (Hu et al., 2023)

I kit commerciali presentano comunemente come target gli anticorpi nei confronti delle proteine p53 e p30 che si manifestano durante le prime fasi dell'infezione.

È stato validato e commercializzato anche un test penside (test immunocromatografico a flusso laterale) per la rilevazione degli anticorpi.

In futuro potrebbe essere importante per i ricercatori indagare in maniera approfondita le proteine virali e ideare tecniche di rilevamento degli anticorpi che accertino lo stadio dell'infezione in atto, con particolare attenzione nell'identificare i portatori latenti del virus. Occorre ricordare che la viremia manifestata a seguito dell'infezione da varianti attenuate di ASFV è caratterizzata da episodi intermittenti, di conseguenza basarsi solo sul rilevamento del patogeno può portare a trascurare i soggetti positivi, rendendo necessario indagare anche la presenza di anticorpi per superare questa eventualità. (Hu et al., 2023)

Negli ultimi anni sono stati condotti studi approfonditi per valutare la specificità e la sensibilità dei test sierologici per la PSA nei diversi scenari epidemiologici di Africa ed Europa. Questi studi hanno incluso isolati del genotipo II dell'ASFV attualmente in circolazione nell'Europa orientale e isolati dell'Africa orientale che presentano una maggiore variabilità. I risultati hanno dimostrato che i test raccomandati dall'OIE per la certificazione degli animali prima dello spostamento sono in grado di rilevare la presenza di anticorpi anti-ASFV in tutte le situazioni epidemiologiche valutate con accuratezza e sensibilità adeguate (C. Gallardo et al., 2013; C. Gallardo, Nieto, et al., 2015). Nelle zone endemiche la conferma di casi sospetti di malattia può essere effettuata utilizzando un test sierologico standard (ELISA) combinato con un test sierologico alternativo (IFAT, IPT, IBT) e un test di rilevamento dell'antigene.

In alcuni Paesi oltre il 95% dei casi positivi è stato identificato utilizzando una combinazione di IFAT e FAT. È importante sottolineare che se i suini sono stati infettati da isolati avirulenti o a bassa virulenza i test sierologici possono essere l'unico modo per identificare gli infetti.

ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSEY - ELISA

L'ELISA è un test diretto in grado di rilevare anticorpi anti-ASFV nei suini infettati da virus a bassa o moderata virulenza. Esistono attualmente in commercio diversi kit ELISA basati su un formato competitivo o indiretto e validati per l'identificazione di anticorpi anti-ASFV in differenti situazioni epidemiologiche. Un'alternativa più economica consiste nella preparazione di un antigene solubile per l'utilizzo di un ELISA indiretto.

Si raccomanda di effettuare un secondo test di conferma con IBT, IFAT o IPT nel caso di un risultato dubbio o positivo se si sospetta una cattiva conservazione dei campioni di sieri.

INDIRECT IMMUNOPEROXIDASE TEST – IPT

L'IPT è una tecnica di immunocitochimica che consente di determinare la formazione di complessi antigene-anticorpo attraverso l'azione dell'enzima perossidasi. In questa procedura cellule renali di scimmia verde africana (Vero) o cellule MS vengono infettate con isolati di ASFV adattati a queste colture cellulari. Le cellule infette vengono fissate e utilizzate come antigeni per determinare la presenza di anticorpi specifici contro l'ASFV.

L'IPT è consigliato come test di conferma per i sieri provenienti da zone indenni da ASF che risultano positivi all'ELISA e per i sieri provenienti da zone endemiche che mostrano un risultato

inconcludente all'ELISA. Data la sua maggiore sensibilità e affidabilità IPT rappresenta il test migliore per analizzare campioni di sangue, di fluidi o essudati (C. Gallardo, Nieto, et al., 2015)

INDIRECT FLUORESCENT ANTIBODY TEST

Il IFAT (immunofluorescenza indiretta per la ricerca di Ac) (Sanchez-Vizcaino, 1987) può essere utilizzato come conferma per sieri provenienti da zone considerate indenni da PSA che risultano positivi all'ELISA oppure per sieri provenienti da zone endemiche che mostrano un risultato non definitivo all'ELISA.

IMMUNOBLOTTING TEST

Questo test rappresenta un'alternativa all'IFAT e al test IPT per la conferma di risultati equivoci su sieri individuali. Fornisce risultati idonei su campioni debolmente positivi nella rilevazione di anticorpi anti-ASFV a partire dalla seconda settimana dall'infezione.

Mediante immunoblotting sono state identificate le proteine virali che inducono anticorpi specifici nei suini. Questi polipeptidi sono stati inseriti su strisce di antigene e hanno mostrato una reazione con gli anticorpi specifici a partire da 9 giorni post infezione.

PROGRESSI IN CAMPO DIAGNOSTICO

Nei prossimi tempi sarà necessario un impegno formidabile nell'implementare i test di rilevamento da usare in loco soprattutto in circostanze che comprendono la quarantena per l'import/export e il trasporto interregionale di suini vivi. Le caratteristiche dell'infezione latente sono ancora da indagare, le tecnologie di rilevamento utilizzate mancano di precisione nell'identificare i suini in questo stato immunitario. Saranno necessarie nuove tecnologie atte a valutare tramite screening rapidi l'eventuale presenza di infezioni latenti per un migliore controllo della diffusione della PSA. (Hu et al., 2023)

Attualmente la ricerca ha portato all'utilizzo di tecniche innovative anche in laboratorio come la RT- q PCR o real time PCR con fluorescenza, la Propodium monoazide (PMA) – q PCR, la d PCR o PCR digitale, oltre a metodi di indagine utilizzabili in loco come recombinase polymerase amplification (RPA)/recombinase-aidamplification (RAA), loop-mediated isothermail amplification (LAMP), jumping rolling circle amplification (SRCA), cross-priming amplification (CPA) e cluster regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR). (Hu et al., 2023)

CINGHIALI SELVATICI

Il controllo della PSA nei cinghiali dipende in larga misura da un rilevamento precoce e da una diagnosi rapida e affidabile (Arias et al., 2018). A causa dell'obbligo di notifica internazionale la diagnosi di laboratorio è regolata da raccomandazioni e requisiti legali. Metodi e protocolli possono essere trovati nel Manuale dei test diagnostici e dei vaccini per animali terrestri dell'OIE (WOAH, 2021). In generale esistono strumenti affidabili per la diagnosi diretta (rilevamento del patogeno) e indiretta (rilevamento degli anticorpi) della PSA che funzionano con campioni appropriati provenienti sia da suini domestici che dai cinghiali (C. Gallardo, Fernández-Pinero, et al., 2019). Non vi è alcuna differenza nelle prestazioni del test o nell'idoneità delle matrici quando si testano campioni di alta qualità provenienti da entrambi gli animali. (Pikalo et al., 2021)

I metodi di rilevamento diretto hanno la priorità per rilevare la malattia nelle aree indenni e a rischio. Per la diagnosi precoce soprattutto nella fase preclinica i campioni di sangue e milza EDTA sono più adatti utilizzando tutti i tipi di metodi PCR in tempo reale (Elnagar et al., 2021; Pikalo et al., 2021). In questa fase i campioni di siero possono invece produrre risultati falsi negativi, soprattutto se si applica il pooling (Pikalo et al., 2021). Sono idonei all'esecuzione del test anche campioni di tonsille, linfonodi, midollo osseo, polmone, fegato e reni.

Negli ultimi anni i tamponi di sangue secco sono stati convalidati per l'utilizzo nella sorveglianza passiva in contesti sperimentali e limitati sul campo (Blome, Goller, et al., 2014; Carlson et al., 2018; Elnagar et al., 2021; Petrov et al., 2014; Pikalo et al., 2021). Si potrebbe dimostrare che questi campioni sono adatti per la rilevazione mediante PCR del genoma virale della PSA e, con alcune limitazioni, per la rilevazione di anticorpi. Recentemente sulla stessa linea sono stati testati tamponi floccati e tamponi di trasporto inattivanti con risultati molto promettenti, in particolare per il sistema di tamponi di trasporto (Pikalo et al., 2021)

In seguito all'introduzione della PSA in una nuova regione il rilevamento degli anticorpi diventa un prezioso strumento diagnostico per monitorare l'evoluzione della malattia e i potenziali cambiamenti nella virulenza del virus della PSA. Per la rilevazione degli anticorpi i campioni di siero e plasma sono la prima scelta menzionata nei manuali per suini domestici e cinghiali.

L'isolamento del virus è il gold standard tra i test ed è necessario per ottenere gli isolati da sottoporre ad un'eventuale e ulteriore caratterizzazione. A causa di considerazioni sulla biosicurezza e della necessità di colture sensibili di cellule primarie, questa tecnica viene

solitamente applicata solo nei laboratori di riferimento secondo protocolli standard (A. L. Carrascosa et al., 2011). Di solito come lettura viene utilizzato il valore di emoadsorbimento (per i ceppi emoadsorbenti). Lo screening per gli anticorpi specifici del virus della PSA viene solitamente effettuato con metodi basati sui test ELISA. È necessario notare che i campioni di siero di scarsa qualità (poiché sono spesso ottenuti da cinghiali trovati morti) possono influenzare la specificità del test. Per questo motivo si raccomandano dei test di conferma (C. Gallardo, Fernández-Pinero, et al., 2019). Tra questi test ricordiamo IPT o immunoblotting.(Sauter-Louis et al., 2021)

CAPITOLO III: SITUAZIONE EPIDEMIOLOGICA PASSATO VS PRESENTE

Il primo caso di PSA fu diagnosticato in Kenya nel 1909 e riportato nel 1921 da Montgomery (Eustace Montgomery, 1921) come primo caso di una nuova malattia differente dalla Peste Suina Classica. (Cwynar et al., 2019)

Si ritiene che la fonte dell'infezione sia derivata dal mantenimento del virus ASFV all'interno di un antico ciclo selvatico africano che vedeva come ospiti naturali del virus i facoceri (*Phacochoerus africanus*) e le zecche molli *Ornithodoros*. (Gaudreault et al., 2020).

A partire da questo primo focolaio il virus si è diffuso nei paesi dell'Africa sub-Sahariana, nei quali ad oggi è ancora endemico, arrivando ad infettare anche la popolazione di suini domestici in più di 35 paesi africani. (M. Penrith et al., 2019). Dei 24 genotipi individuati solo cinque sono conosciuti come genotipi adattati all'ospite suino (I, II, VIII, IX e X), e due su cinque (I, II) sono i responsabili di numerose incursioni in paesi al di fuori dell'Africa. (Njau et al., 2021)

Nonostante la malattia sia emersa per la prima volta nel diciannovesimo secolo ha continuato negli anni a diffondere dall'Africa a svariati paesi del mondo con conseguenze disastrose per l'industria suinicola globale. L'incremento nella diffusione e nella trasmissione della patologia è dovuto all'aumento della richiesta di carne suina e di conseguenza ad un implemento della movimentazione transfrontaliera di suini e di prodotti da essi derivati per rispondere alla domanda sempre crescente. (Njau et al., 2021)

Lo studio di Cwynar et al. propone una suddivisione temporale della storia epidemiologica che ha attraversato l'Europa a partire dalla prima comparsa della malattia. In figura 3 è riportata una mappa della suddivisione in Stati dell'Unione Europea.

È possibile suddividere le epidemie che hanno attraversato l'Europa in due periodi cronologici distinti: il primo periodo riguarda la diffusione della PSA in Europa occidentale che ha inizio nel 1957 e termina nel 1995. Lo studio genomico ha dimostrato che gli isolati identificati in questa prima fase europea appartenevano al genotipo I di ASFV. (Costard et al., 2009)

Il secondo periodo coinvolge l'Europa orientale tra il 2007 e il 2018 (Cwynar et al., 2019) estendendosi alla maggior parte dei Paesi europei anche ai giorni nostri. Il genotipo riscontrato in questi casi è il genotipo II identificato per la prima volta in Georgia nel 2007. (Rowlands et al., 2008)



Figura 3: mappa dell'Unione Europea (European Union, n.d.)

PRIMA ONDATA EUROPEA

La PSA è stata identificata per la prima volta in Europa nel 1957 precisamente a Lisbona, in Portogallo. Le indagini epidemiologiche hanno dimostrato che la causa di questa prima incursione del virus al di fuori dell'Africa fosse ascrivibile all'introduzione di rifiuti alimentari contaminati, provenienti da voli di compagnie aeree africane e/o da navi che attraccavano nei porti, i cui rifiuti alimentari furono utilizzati per nutrire i maiali, oltre ad una possibile diffusione di zecche molli infette nei territori europei. (Arias & Sánchez-Vizcaíno, 2002; Cwynar et al., 2019)

A seguito di questa prima comparsa del virus in Portogallo ha inizio la **prima ondata europea**

che dura **dal 1960 fino al 1995** e colpisce suini domestici e cinghiali selvatici euroasiatici.

Nel 1995 la malattia è stata eradicata dai territori europei attraverso la messa in atto di rigorosi piani di eradicazione e controllo. (Cwynar et al., 2019) L'unica eccezione è stata la Sardegna che dalla notifica del primo focolaio (1978) ha continuato a combattere contro questa malattia.

La prima ondata europea ha portato ad una diffusione del virus molto rapida anche negli altri paesi dell'Ovest dell'Europa. La Spagna fu il primo paese a riportare dei casi di PSA nel 1960, seguita da Madeira (1965, 1974, 1976), Italia (1967, 1969, 1993), Francia (1964, 1967, 1974), Sardegna (1978), Malta (1978), Belgio (1985), Paesi Bassi (1986). (Gaudreault et al., 2020)

Dal 1978 al 1995 è stato documentato un aumento dell'incidenza dei casi di PSA in Portogallo e in Spagna probabilmente dovuto alla concomitanza di vari fattori. (Bech-Nielsen et al., 1995)

La persistenza del virus nell'ambiente è molto elevata soprattutto a causa delle condizioni di biosicurezza inadeguate negli allevamenti domestici del territorio, vi è poi una grande presenza di zecche molli *Ornithodoros* che fungono da serbatoi a lungo termine, oltre ad una massiva presenza di cinghiali selvatici nel Parco Nazionale Doñana, nella regione di Huelva in Spagna. (EFSA, n.d.; Mur, Boadella, et al., 2012)

Si può inoltre osservare che solo il 5,8% dei focolai nei suini domestici in Spagna fino al 1981 è associato ad un contatto diretto tra la popolazione domestica e i cinghiali selvatici poiché la popolazione di cinghiali in questi territori era nettamente inferiore a quella riscontrabile nei paesi dell'Europa centrale o orientale. (Mur, Martínez-López, et al., 2012)

Nel 1995 la PSA è stata eradicata dalla popolazione suina spagnola dopo 35 anni di sforzi per migliorare le misure di biosicurezza, implementare la caccia ai cinghiali ed abbattere le mandrie colpite. Dal 1994 al 1999, anno in cui è stato registrato l'ultimo focolaio nella Penisola Iberica, non si sono verificati nuovi casi di PSA confermati tra Spagna e Portogallo. (EFSA, n.d.; Mur, Boadella, et al., 2012)

Data la presenza di focolai in Spagna non sorprende pensare che in quegli anni siano stati notificati dei casi anche in Francia e Italia, senza però influenzare la produzione suinicola locale in maniera importante. I focolai in Italia e Francia sono stati seguiti da rapidi processi di eradicazione, tra le misure adottate spiccano la caccia al cinghiale e la soppressione dei soggetti infetti in allevamento. Si ritiene che i Pirenei abbiano costituito una barriera naturale che ha ridotto al minimo la diffusione del virus attraverso il movimento di serbatoi infetti (zecche e

cinghiali) tra Spagna e Francia. Allo stesso modo si ritiene che anche le Alpi abbiano svolto lo stesso ruolo tra Italia e Francia. (Cwynar et al., 2019; Lange et al., 2014; Van Schepen & Kunesh, 1981)

L'eradicazione della malattia a Malta nel 1978 è stata ottenuta con l'abbattimento dell'intera popolazione suina. (Cwynar et al., 2019)

La Sardegna costituisce l'eccezione al piano di eradicazione che ha messo fine alla prima ondata europea. Fin dalla prima apparizione di ASFV in territorio sardo nel 1978 non è mai stata ottenuta l'eradicazione del virus, diventato endemico tra i suini domestici e quelli selvatici. (Costard et al., 2013; Lange et al., 2014; Oganessian et al., 2013)

Tra i motivi che impediscono che ciò avvenga rientra soprattutto il tipo di allevamento tradizionale diffuso sull'isola, ovvero di tipo estensivo per il 70% dei capi o da cortile, combinato con una maggiore possibilità di contatto tra cinghiali selvatici e suini domestici. (Firinù & Scarano, 1988; Zakaryan & Revilla, 2016)

Nonostante la situazione Sarda ad oggi risulti particolare, come sarà approfondito in seguito, non ci sono prove che in passato colleghino la presenza di PSA nell'isola con la diffusione della patologia in altri stati europei. (Costard et al., 2013; Lange et al., 2014; "Scientific Opinion on African Swine Fever," 2010)

Il primo caso in Belgio è stato segnalato nelle Fiandre occidentali nel marzo 1985. Sebbene non ci fossero conferme sull'origine dell'infezione virale la fonte più probabile è stata identificata nell'importazione di carne suina contaminata dalla Spagna. È stato tempestivamente messo in atto un programma di prevenzione ed eradicazione ben strutturato che ha comportato l'eliminazione degli allevamenti suini colpiti. Dopo un'analisi sierologica degli allevamenti suini ancora presenti il piano di eradicazione è stato portato a termine nel settembre dello stesso anno. (Biront et al., 1987; "Scientific Opinion on African Swine Fever," 2010)

Il primo rilevamento di ASFV nei Paesi Bassi risale al 1986 nell'Olanda meridionale vicino all'Aia. La fonte è stata individuata nei rifiuti alimentari contaminati che provenivano da edifici pubblici locali (alberghi, ristoranti e ospedali) ed erano stati utilizzati per l'alimentazione animale.

Sebbene il focolaio sia stato confermato in tre settimane ciò non ha impedito una larga diffusione della malattia che ha portato come risultato alla perdita del 19% della popolazione suinicola che al tempo abitava il paese. ("Scientific Opinion on African Swine Fever," 2010; Terpstra & Wensvoort, 1986)

Mentre il quadro in Europa era così delineato, la PSA è stata segnalata per la prima volta in Russia nel 1977.

Come riportato nella review di Costard (Costard et al., 2009) nel 1971 c'è stato un primo riscontro di ASFV a Cuba, il primo paese Caraibico ad essere colpito; si ritiene che l'introduzione del virus fu dovuta a traffici commerciali con la Spagna. (Seifert H. S. H., 1996)

La PSA fu presto notificata a partire dagli anni '70 in altre isole Caraibiche: ancora Cuba (1978 e 1980), Repubblica Dominicana (1978 e 1981) e Haiti (1979 e 1984 (Wilkinson, 1984), con gli ultimi focolai nelle Americhe verificatesi lì tra il 1980 e il 1984. I primi casi furono registrati in Brasile nel 1978, probabilmente l'introduzione del virus si ebbe a causa di scambi commerciali con Spagna o Portogallo, attraverso rifiuti alimentari contaminati provenienti anche in questo caso da voli transcontinentali o da prodotti alimentari importati dai turisti. La data dell'ultimo riscontro in Brasile è il 1981. (Lyra T. M., 2006)

Verso la metà degli anni '90 la PSA era stata eradicata al di fuori dell'Africa con eccezione per il focolaio isolato in Portogallo nel 1999 e per la Sardegna, in cui era ancora endemica.

SECONDA ONDATA EUROPEA

La **seconda ondata europea** si è sviluppata tra il **2007 e il 2018**. (Costard et al., 2009)

Il primo caso è avvenuto in Georgia nel 2007, seguito da nuovi focolai tra i suini domestici e i cinghiali selvatici che si ebbero nella Federazione Russa (2008), Ucraina (2012), Bielorussia (2013). (Gogin et al., 2013; Sánchez-Vizcaíno et al., 2015; "Scientific Opinion on African Swine Fever," 2014) Questa rapida infiltrazione della patologia nell'Europa orientale e nell'Asia occidentale è probabilmente avvenuta a causa di lacune nel rispetto dei piani di sorveglianza e controllo della patologia, oltre che alla carenza di misure di biosicurezza. ("Scientific Opinion on African Swine Fever," 2010)

Alcuni autori hanno affermato che la diffusione della PSA nei paesi dell'Europa Orientale sia attribuibile alla combinazione di più fattori preponderanti nel contesto di crisi economica del secolo attuale. Tra questi fattori rientra la diffusione della PSA a partire da aree in cui la malattia era già endemica, nel 1994 si ebbe in effetti una notevole diffusione del virus anche in paesi africani inizialmente indenni. Ricordiamo poi l'aumento della produzione suinicola mondiale dovuto ad una maggiore richiesta sociale, la presenza di suini asintomatici che si sono comportati da serbatoi e diffusori della malattia, infine ma non per ultima la globalizzazione che

ha cambiato il mercato forgiando la base di questi cambiamenti. (M.-L. Penrith & Vosloo, 2009; Sánchez-Vizcaíno et al., 2013)

GEORGIA

La prima diagnosi ufficiale di PSA in Georgia è stata riportata al WOAH il 5 giugno del 2007, in seguito sono stati notificati diversi focolai sul territorio georgiano. Sebbene inizialmente la malattia presentata dai suini fosse stata collegata alla circolazione del Circovirus suino (PMWS, Post Weaning Multisystemic Wasting Syndrome) i test ufficiali svolti nel laboratorio di riferimento OIE a Pirbright, in Gran Bretagna (FAO, 2007) hanno confermato la diagnosi di PSA.

L'analisi delle sequenze dell'isolato in Georgia nel 2007 ha dimostrato che il virus ASF è strettamente correlato agli isolati appartenenti al genotipo II che circolavano in Mozambico, Madagascar e Zambia. (Rowlands et al., 2008)

La fonte di infezione è ritenuta essere l'utilizzo di prodotti a base di carne contaminata per l'alimentazione dei suini domestici. I rifiuti provenivano da navi internazionali che arrivarono al porto di Poti sul Mar Nero, nella regione di Samegrelo-Zemo Svaneti. (Rowlands et al., 2008)

Occorre ricordare che il settore degli allevamenti in Georgia era per lo più organizzato in piccole aziende agricole (professionali e semi professionali) e piccole stalle di privati allestite nei cortili. Questa tipologia di allevamento è una pratica tradizionale nel paese è fonte di cibo per la popolazione delle campagne, mezzo di sostentamento economico mediante la vendita dei capi nel libero mercato o tramite la compravendita diretta con i clienti. (FAO, 2007)

La densità suinicola maggiore si trovava nelle aree Est e Ovest del Paese. Pochi capi erano invece allevati nelle aree al confine con Russia, Turchia e Armenia.

Da quel momento sono state messe in atto misure di prevenzione e misure di controllo della diffusione della patologia tra cui l'abbattimento degli animali infetti e degli animali in contatto con essi, oltre all'isolamento delle proprietà considerate sospette. (Lange et al., 2014)

Nonostante gli accorgimenti messi in atto oltre il 19% della popolazione di suini domestici georgiani (più di 60000) è stata infettata entro i primi due mesi dalla comparsa di ASFV e gli animali sono stati abbattuti. (Lange et al., 2014) Si ritiene che il numero di casi sia stato sottostimato a causa di falle nella sorveglianza, della mancanza di un sistema di notifiche tempestive e dell'infezione dei cinghiali selvatici che hanno contribuito alla diffusione della malattia. (FAO, 2007)

Dalla Georgia ASFV si è diffuso in Abkhazia e Ossezia del Sud, poi anche in Armenia e Azerbaijan. (Rowlands et al., 2008) Il virus della PSA circolante in queste aree appartiene al genotipo II. (Kolbasov et al., 2018)

FEDERAZIONE RUSSA

Nel novembre 2007 il virus della PSA è stato rilevato anche nella Federazione Russa (il primo focolaio risale al 1977) nella carcassa di un cinghiale morto trovato al confine con la Georgia. (Rowlands et al., 2008)

Si ritiene che la principale fonte di trasmissione sia stata la presenza di cinghiali morti infetti a Shatol'skoe Ushchel'e, lungo il fiume Argoun in Ceceniad un'area al confine con la Georgia. (Lange et al., 2014; Oganessian et al., 2013).

Differentemente da quanto avvenuto negli altri paesi dell'Europa orientale non appartenenti all'UE, nei quali l'introduzione del virus era dovuta principalmente alla movimentazione dei suini e dei loro prodotti derivati contaminati, il caso della Federazione Russa è stato particolare. La principale fonte di trasmissione del virus è legata alla presenza di cinghiali infetti provenienti dai territori limitrofi. (Gogin et al., 2013) La successiva diffusione del virus dopo i primi focolai fu dovuta invece alla presenza di rifiuti contaminati, spazzatura e veicoli infetti, oltre alle scarse misure di biosicurezza messe in atto negli allevamenti all'aperto. (Oganessian et al., 2013) Questi fattori contribuirono a complicare il controllo della patologia.

A causa della massiva diffusione del virus tra i cinghiali selvatici nei distretti infetti della Repubblica Cecena, ASFV si è diffuso anche nelle regioni del Caucaso settentrionale, raggiungendo la popolazione di cinghiali nei territori di Ingushetia (giugno 2008), Ossetia del Nord (giugno 2008), Kabardino-Balkaria (dicembre 2008) e Dagestan (settembre-ottobre 2009 e marzo 2010). (Gogin et al., 2013; Lange et al., 2014)

Il primo focolaio tra i suini domestici è stato registrato in un allevamento tradizionale all'aperto nel giugno 2008 in Ossetia del Nord. (Oganessian et al., 2013) Nel gennaio 2009 ASFV è stato rilevato nei cinghiali nella regione di Stavropol, a oltre 150 km dai primi focolai nella Federazione Russa. Nella stessa regione nell'arco di tre anni sono stati riportati in totale 177 focolai. (Oganessian et al., 2013)

Dal 2009 al 2010 si è registrato un aumento significativo del numero dei casi notificati tra i cinghiali e i suini domestici nel Sud del paese. (Oganessian et al., 2013) Gli allevamenti suinicoli

tradizionali all'aperto furono particolarmente colpiti a causa della possibilità di contatto con i cinghiali selvatici. Ciò ha reso particolarmente difficoltoso attuare un piano di eradicazione. (Bosch, Rodríguez, et al., 2017)

Il comportamento umano ha avuto un ruolo rilevante nella diffusione della PSA nella Federazione Russa: l'errato o non sicuro smaltimento delle carcasse dei suini infetti ha costituito una fonte costante di introduzione del virus nella popolazione dei cinghiali selvatici. (Gogin et al., 2013) La trasmissione del virus ai cinghiali comporta un grave pericolo perché di norma potrebbe anche causare una ricaduta di casi nei suini domestici a causa della scarsa biosicurezza applicata negli allevamenti. (Arias et al., 2018)

Dal 2011 la malattia si è diffusa anche al Nord raggiungendo San Pietroburgo, Archangel e Murmansk, zone prima indenni. (Oganesyan et al., 2013)

Dal 2012 la PSA è giunta nella regione di Krasnodarskiy, nel Distretto Federale Meridionale russo, sopra al Mar Nero, ciò indica un grande allargamento delle aree interessate.

Nel 2013 sono stati registrati focolai anche nella parte occidentale della Federazione Russa, comprese le regioni di Smolensk e Pskov, al confine con la Bielorussia, allarmando gli Stati membri dell'UE. (Costard et al., 2013)

L'EFSA ha riportato che dal 2007 il 40% di tutti i focolai si siano verificati nella fauna selvatica. Secondo Zakharova et al. i casi registrati nella Federazione Russa dal 2007 al 2022 hanno mostrato principalmente un carattere sporadico, mai epidemico. I fattori ecologici che contribuiscono al mantenimento del virus nell'ambiente rendono difficile l'eradicazione della malattia nella popolazione dei cinghiali. (Korennoy et al., 2014; Tiwari et al., 2022; Ungur et al., 2022) Il monitoraggio dei cinghiali è una componente importante della sorveglianza e delle misure di prevenzione. (M. P. Ryser-Degiorgis, 2013) Questa attività serve a rilevare tempestivamente i casi di positività al virus e applicare le misure efficaci a prevenirne la diffusione in aree indenni. (M. Ryser-Degiorgis et al., 2015)

In generale la densità della popolazione dei cinghiali nel territorio varia in modo dinamico a causa delle misure attive di spopolamento e della migrazione dei cinghiali stessi.

È fondamentale avere una stima precisa del numero di soggetti presenti in una data area per poter definire il volume di rimozione degli stessi. (Cross et al., 2013; Kay et al., 2017; Meng et al., 2009) A tal fine torna utile l'impiego dei sistemi informativi geografici (GIS) che forniscono

dei modelli spazio-temporali di insorgenza della malattia in relazione alla densità di popolazione suscettibile e consentono di determinare le aree in cui si verifica la trasmissione attiva del patogeno, partecipando alla valutazione del rischio. (Glazunova et al., 2021; Malkhazova et al., 2019; Oganesyanyan et al., 2013)

Attualmente il paese vive una situazione epidemica di diffusione della PSA.

Secondo lo studio di Zakharova et al. che mette in relazione la densità della popolazione di cinghiali con le aree in cui si sono verificati più casi, è emerso che la diffusione della patologia presenta una certa stagionalità, con i picchi di contagio tra i cinghiali che si verificano tra novembre e dicembre e tra luglio e agosto. Il picco invernale potrebbe essere dovuto alle caratteristiche biologiche degli animali come la stagione riproduttiva e il raggruppamento delle mandrie. Il picco estivo è dovuto probabilmente alle attività umane, come le camminate nelle foreste e le attività di caccia, o l'abbandono di fomite o materiale alimentare contaminato in prossimità di allevamenti suini all'aperto.

I metodi di rilevamento spazio-temporali delle aree con maggiore densità di cinghiali (clusters) hanno un ruolo importante nella ricerca epidemiologica oltre che nella pratica della sanità pubblica e nella prevenzione veterinaria, che sono fondamentali nel controllo ed eradicazione. Ad oggi questo approccio orientato al problema che prevede l'utilizzo di metodi di analisi spazio-temporali dei focolai di PSA potrebbe risultare utile ad identificare le zone a rischio e valutare l'efficacia delle misure di prevenzione tra cui lo spopolamento. (Zakharova et al., 2023)

UCRAINA

Il primo caso di PSA in Ucraina è stato registrato nel marzo 1977 nella regione di Odessa e l'epizoozia è stata eliminata in 6 mesi attraverso l'abbattimento di tutti i soggetti infetti.

La causa di infezione è stata identificata nell'importazione di carne di maiale da parte di marinai arrivati al porto della città. Nel porto era presente un allevamento sussidiario in cui venivano utilizzati come cibo per i suini gli scarti alimentari provenienti dalle cucine delle navi, che arrivavano anche dal Brasile e dalla Repubblica Dominicana. Ci furono due focolai secondari notificati nelle regioni di Kiev e Sverdlovsk, a causa della movimentazione di pacchi contenenti cibo contaminato, ma furono estinti. (Omelchenko et al., 2022)

La prima epidemia ufficiale di PSA in Ucraina notificata all'OIE si è verificata il 30 luglio 2012, nella regione di Zaporozhye vicino al Mar Nero. (Bosch, Rodríguez, et al., 2017; Sánchez-Vizcaíno et al., 2015; "Scientific Opinion on African Swine Fever," 2014)

Il caso riguardava il decesso di tre suini domestici in una fattoria; è stata avviata un'azione immediata da parte del governo per abbattere gli animali nelle aree infette e stabilire zone di quarantena. (Cwynar et al., 2019; Lange et al., 2014; “Scientific Opinion on African Swine Fever,” 2014)

La probabile fonte di infezione è stata l'introduzione di cibo contaminato da parte di turisti provenienti dalla Federazione Russa. È stato messo in atto un piano volto a localizzare ed eliminare il focolaio, determinando le aree di interesse e di rischio, trasferendo gli allevamenti di suini in unità chiuse, evitando il contatto con altri animali.

Negli allevamenti di grandi dimensioni sono state introdotte misure quali il cambio d'abiti obbligatorio e procedure aggiuntive di disinfezione. In 17 mesi l'attuazione di queste misure ha portato all'estinzione del focolaio. (Omelchenko et al., 2022)

Secondo EFSA il secondo caso confermato riguarda invece un cinghiale trovato morto sulla riva del fiume Derkul, nella regione di Rostovskaya il 5 gennaio del 2014, ad 1,5 km del confine con la Federazione Russa (a più di 300 km dal primo caso). In questo caso la fonte della trasmissione del virus furono dei cinghiali infetti provenienti dalla Russia. I focolai notificati in seguito sono scoppiati principalmente nella popolazione di cinghiali selvatici.

L'attività di caccia al cinghiale praticata in queste zone di confine ha portato alla scoperta di altri cinghiali infetti da ASFV probabilmente provenienti da Russia e Bielorussia. (Omelchenko et al., 2022)

Come riportato dall'analisi di Omelchenko et al. la maggior parte dei focolai registrati in Ucraina tra il 2012 e il 2022 sono avvenuti tra il periodo autunnale e invernale. Tra il 2012 e il 2013 i focolai notificati sono stati registrati in aree boschive. Tra il 2014 e il 2016 la PSA ha avuto una maggiore diffusione tra gli allevamenti domestici e la fonte di contagio è stata la trasmissione umana.

Le segnalazioni di focolai tra il 2017 e il 2018 sono state incessanti, si stima che ci sia stata una notifica di focolaio nei suini domestici ogni due giorni; sono state colpite maggiormente le aree di Odessa (soprattutto tra 2016 e 2018), Poltava (2015, 2017 e 2020) e Mykolaiv (2019 e 2021). Questa prevalenza così elevata derivava probabilmente dalle falle nella gestione sanitaria del Paese, ad esempio dal fatto che non fosse previsto un obbligo di possesso di certificato sanitario di indennità per i suini domestici movimentati, oltre alla pratica di compravendita illegale di suini e di prodotti da essi derivati.

In Ucraina è stata osservata così come in altri Paesi una certa stagionalità nell'incidenza dei focolai che si sono verificati soprattutto in estate e autunno, ad eccezione del 2017 anno in cui il numero maggiore di casi rilevati è stato registrato in inverno.

Una fonte di trasmissione a sostegno di questa ipotesi potrebbe essere rintracciata nell'attività degli agricoltori, impegnati nell'utilizzo di macchine agricole su campi contaminati soprattutto nei periodi estivi oppure all'utilizzo di mangimi contaminati prodotti in zone in cui vi erano dei focolai non registrati. (Omelchenko et al., 2022)

La persistenza e la diffusione dell'epidemia probabilmente è dipesa anche dalla scarsa attuazione di misure di biosicurezza, dalla mancanza di informazioni riguardo alla pericolosità della malattia, da uno smaltimento improprio delle carcasse dei suini infetti all'interno di discariche o foreste, incrementando la trasmissione tra i cinghiali selvatici, oltre allo stoccaggio per lunghi periodi di carne suina contaminata in macelli nei quali avvenivano anche traffici illegali.

Sarebbe necessario prevedere un maggiore controllo delle misure di biosicurezza, provvedere al trasferimento degli allevamenti domestici in strutture commerciali ben protette, improntare un miglioramento del piano di sorveglianza attiva e passiva. Le condizioni storico-politiche del territorio purtroppo attualmente impediscono che un tale sforzo sia dedicato al contrasto dell'epidemia. (Omelchenko et al., 2022)

BIELORUSSIA

I primi rilevamenti di PSA in Bielorussia risalgono al 21 giugno 2013 con il ritrovamento di suini domestici infetti in un allevamento nella regione di Grodno. (Bosch, Rodríguez, et al., 2017; Sánchez-Vizcaíno et al., 2015; "Scientific Opinion on African Swine Fever," 2014)

Il secondo caso è stato segnalato il 4 luglio 2013 nella regione di Vitebsk a 400 km dal primo focolaio. Si ritiene che i due focolai non siano epidemiologicamente collegati.

Sembra che il primo sia dovuto all'utilizzo di mangime contaminato di origine sconosciuta per l'alimentazione dei suini nell'allevamento colpito. Il secondo caso, che si è verificato in un grande allevamento, sembra derivare dalla caccia di cinghiali nella Federazione Russa avvenuta all'interno di un'area infetta. (WOAH, 2015) Occorre evidenziare che i collegamenti tra le popolazioni di cinghiali tra Bielorussia e Polonia, Lituania e Ucraina, possano aumentare la circolazione di ASFV tra questi territori e aumentare la possibilità di future epidemie. ("Scientific Opinion on African Swine Fever," 2010)

Nonostante la densità di popolazione dei cinghiali sia bassa e vari da 3 a 6 cinghiali/km² non è esclusa la possibilità di una rapida diffusione della PSA negli stati UE. (“African Swine Fever,” 2015) Ulteriori rinvenimenti di PSA in Bielorussia sono stati molto rari.

LITUANIA

Il 24 gennaio del 2014 il Servizio Alimentare e Veterinario statale lituano ha condotto delle analisi di laboratorio che hanno confermato il primo focolaio di PSA in due carcasse di cinghiale nel distretto di Varena. (“African Swine Fever,” 2015; Cwynar et al., 2019)

La Lituania è stato il primo paese dell’Unione Europea a rilevare la presenza di ASFV genotipo II per poi diffondersi negli altri paesi UE (Estonia, Lettonia, Polonia, Repubblica Ceca, Ungheria, Romania, Bulgaria, Belgio, Slovacchia).(Gervasi et al., 2019)

La prima carcassa in Lituania fu ritrovata a 40 km dal confine con la Bielorussia, la seconda a soli 5 km di distanza. (“African Swine Fever,” 2015) Entrambi i casi sono stati confermati dal Laboratorio di riferimento per l’Unione Europea per la Peste Suina Africana (EURL) e hanno riportato un’omologia del 100% con l’isolato di ASFV bielorusso identificato a Grodno nel 2014. (“African Swine Fever,” 2015; K. King et al., 2011) Questo dato conferma che la circolazione del virus sia connessa alla migrazione dei cinghiali.

Il secondo caso risale al 24 luglio 2014 in un grande allevamento di suini domestici nei distretti di Ignalina e Utena in cui erano applicate misure di biosicurezza particolarmente stringenti. L’allevamento era localizzato a 170 km dai primi casi lituani di PSA nei cinghiali, suggerendo che l’epidemia fosse dovuta ad un coinvolgimento umano. (“African Swine Fever,” 2015)

La situazione epidemiologica riguardante la PSA in queste zone dell’Est ha costituito un problema particolarmente serio per la Lituania e i membri dell’Unione Europea poiché il numero di allevamenti intensivi di suini era particolarmente alto, la produzione quasi sempre intensiva e la densità dei cinghiali nella zona particolarmente elevata. (Cwynar et al., 2019)

È stimato che nel 2010 la Lituania vantasse una popolazione di suini domestici di oltre 500 000 capi localizzati per lo più in grandi allevamenti (circa il 60%) organizzati con rigide misure di biosicurezza; le piccole aziende agricole contavano invece un 25% dei suini domestici, in più vi era un 9% di suini allevati in cortile e perciò ad alto rischio di diffusione della patologia. (Eurostat, 2014)

Secondo le previsioni dell'epoca con l'introduzione di ASFV in Lituania si sarebbe innalzato pericolosamente il rischio di diffusione della patologia a tutto il Paese comportando la distruzione del patrimonio suinicolo lituano. Questo scenario pessimistico non si è fortunatamente realizzato grazie all'applicazione delle misure di controllo e di prevenzione della diffusione, alla caccia al cinghiale, alla creazione di recinzioni come barriere artificiali.

La PSA ha continuato a circolare nel paese anche dal 2014 al 2017, anno in cui si è registrato un aumento significativo dei casi rilevati sia nei suini domestici che nei cinghiali. (Pautienius et al., 2018)

Nel 2019 circa l'86% della superficie del territorio lituano appariva interessato dalla PSA. (Mačiulskis et al., 2020; Schulz, Masiulis, et al., 2021)

Da recenti studi risulta che anche i focolai di PSA negli allevamenti di suini domestici in Lituania hanno seguito un andamento stagionale, mostrando una correlazione con l'abbondanza estiva di insetti volanti. Lo stesso modello è stato osservato in Estonia con focolai comparsi soprattutto nei mesi da luglio a settembre. (Nurmoja et al., 2020) Alcuni studi hanno dimostrato come le mosche da stalla (*S. calcitrans*) siano in grado di agire da vettori e di trasmettere il virus nel corso del pasto di sangue su un animale suscettibile. (Turčinavičienė et al., 2021)

Secondo i report EFSA annuali sulla diffusione di ASFV mentre nel resto dei paesi europei è stata riscontrata una decrescita dei casi di infezione verificati, in Lituania i casi notificati nel 2022 sono risultati in leggero aumento a causa di focolai scoppiati nella zona sud ovest del paese.

La tendenza al ribasso ha riguardato per lo più Romania, Polonia e Bulgaria, dove il numero di focolai è apparso ridotto del 50-70% rispetto agli anni precedenti. (Ståhl et al., 2023)

Segue un anno di silenzio nelle notifiche di PSA in Lituania interrotto dall'annuncio di due nuovi focolai nel giugno del 2023. (Valstybinė maistų veterinarijos tarnyba, 2023)

LETTONIA

Il primo caso di infezione da ASFV genotipo II registrato in Lettonia risale al 25 giugno 2014 con tre cinghiali morti nella regione di Latgale, al confine sudorientale con la Bielorussia. (Gulenko et al., 2011) Il giorno seguente sono stati confermati tre casi di PSA in suini domestici provenienti da un allevamento nella regione di Kraslavas a 6 km dalla Bielorussia e più di 70 km

dal confine con la Lituania. I successivi focolai sono stati confermati in carcasse di cinghiali (16 luglio 2014), suini domestici in un allevamento (17 luglio 2014) e altri quattro casi in cui la potenziale fonte di PSA è stata identificata nell'erba contaminata. ("African Swine Fever," 2015)

L'emergenza ha colpito la Lettonia in maniera inaspettata ma la messa in atto delle misure di controllo è stata repentina. Sono stati erogati degli incentivi per la caccia al cinghiale per ridurre la popolazione suscettibile e la raccolta e lo smaltimento delle carcasse infette è stata svolta in modo sicuro, eliminando le fonti di infezione anche dall'ambiente. (Schulz, Oļševskis, et al., 2019)

Nel mese di luglio la patologia ha colpito anche la regione centrale della Lettonia, Madona, con focolai nei suini domestici e nei cinghiali. Nei mesi successivi del 2014 i casi sono via via aumentati di numero e frequenza sia nei suini domestici che nei cinghiali, coinvolgendo più regioni fino al nord del Paese. Fortunatamente gli allevatori lettoni hanno segnalato tutti i casi sospetti subito dopo la comparsa dei primi sintomi clinici, evitando che i focolai si diffondessero velocemente e ottenendo un impatto inferiore sulla produzione suinicola del paese.

("African Swine Fever," 2015)

Sono diverse le ragioni che hanno portato la Lettonia a vivere una diffusione del virus così intensa, ad esempio il fatto che il paese si trovi al centro di un'area infetta confinante con tutti gli altri paesi colpiti. Altri fattori di rischio sono stati senza dubbio l'alimentazione suina con rifiuti di cucina e la presenza di ingenti quantità di altri rifiuti smaltiti illegalmente nelle aree boschive del paese, vicino agli insediamenti umani, oltre all'elevata densità di cinghiali presenti sul territorio che ha giocato a sfavore. ("African Swine Fever," 2015)

Nel novembre 2015 per ridurre la circolazione del virus tra la popolazione di cinghiali le autorità hanno implementato le misure di controllo tra cui la caccia mirata nei confronti dei cinghiali di sesso femminile. (Cwynar et al., 2019)

ESTONIA

In Estonia sono stati identificati dei casi di PSA in località disperse. Il primo caso risale al 2 settembre 2014 e riguardava un cucciolo di cinghiale trovato morto nella regione del Valga (zona cuscinetto per ASFV) a 6 km dal confine con la Lettonia. Sono stati segnalati due altri focolai che hanno coinvolto dei cinghiali il 7 settembre 2014 nella regione di Vijandi (più di 30 km dal primo focolaio) e nella regione di Luganuse il 14 settembre 2014, a 180 km e 150 km dai

primi due focolai e a soli 50 km dalla Federazione Russa, in una zona particolarmente boschiva. ("African Swine Fever," 2015)

Il numero dei suini presenti in Estonia è inferiore a quello di Lettonia e Lituania.

Il 6% di essi si trovava in piccoli allevamenti domestici con bassi livelli di biosicurezza, il 72,7% si trovava in allevamenti di dimensioni maggiori e il 20,4% in allevamenti per l'ingrasso. (Eurostat, 2014) La densità di cinghiali risultava di 0,4-0,6 cinghiale/km², inferiore a quella di Lituania e Lettonia, ma superiore a quella della Federazione Russa.

Nel periodo dal 2015 al 2017 sono stati confermati 27 casi riguardanti suini domestici. (Nurmoja et al., 2020; Vilem et al., 2020) Dal 2018 il numero di focolai nei cinghiali selvatici ha iniziato a diminuire a causa della drastica riduzione della popolazione dei cinghiali del paese.

Da febbraio 2019 alla fine di agosto 2020 si è registrato un periodo lungo 18 mesi in cui non sono stati rilevati casi né nei cinghiali né nei suini domestici nonostante la sorveglianza in corso. (Schulz, Schulz, et al., 2021) Dall'agosto 2020 sono riemersi casi di cinghiali positivi alla PCR in tre contee dell'Estonia separate geograficamente. (Schulz, Schulz, et al., 2021)

Alla fine del 2022 la PSA è stata confermata in sette contee dell'Estonia.

Analogamente ad altri paesi europei la genotipizzazione degli isolati estoni è stata effettuata sulla base del sequenziamento parziale del gene B646L, che codifica per la proteina p72, e ha permesso di raggruppare gli isolati all'interno del genotipo II con un'identità nucleotidica del 100% con il virus isolato in Georgia nel 2007. (Chapman et al., 2011)

Studi più recenti hanno evidenziato l'esistenza di diverse varianti di ASFV rintracciate in Estonia attraverso l'analisi di altre regioni del genoma. Sono state condotte indagini su marcatori molecolari comprovati, come IGR I73R/I329L, MGF505-5R, K145R, O174L e B602L, con l'obiettivo di chiarire se i casi di PSA fossero nuove voci o residui di precedenti epidemie. Le sequenze rilevate nel periodo 2014-2022 sono state confrontate con la sequenza di riferimento Georgia 2007/1 e con i ceppi varianti presenti in Europa. I risultati hanno indicato che non tutti i marcatori molecolari del virus utilizzati con ottimi risultati in altre regioni geografiche erano adatti a tracciare la diffusione della PSA in Estonia. Solo l'analisi del gene B602L ha permesso di collocare gli isolati di PSA che si sono diffusi nel 2020-2022 in due cluster epidemiologicamente diversi. (Vilem et al., 2023)

UNGHERIA

Il primo caso di PSA viene notificato in Ungheria nell'aprile 2018 nella Contea di Heves in un cinghiale ritrovato a circa 70 km a sud del confine con la Repubblica Slovacca. (Boklund et al., 2018) Nel maggio dello stesso anno il virus raggiunge anche la Contea di Szabolcs-Szatmar-Bereg, il cinghiale positivo ad ASFV è stato ritrovato ad 1 km dal confine con l'Ucraina, l'area è stata subito classificata come area ad alto rischio. Nell'ottobre del 2018 si individua il virus in una nuova contea ungherese e viene creata un'altra area di restrizione. Fino al 31 ottobre non viene segnalato nessun caso di positività tra i suini domestici e solo 48 casi sono riportati tra i cinghiali selvatici.

Si sospettava che l'introduzione nella regione di Heves fosse dovuta a prodotti a base di carne di maiale contaminati e importati illegalmente, mentre la causa dell'introduzione nel nord-est del paese era riportata al movimento naturale di cinghiali dall'Ucraina, dove erano stati riscontrati dei casi nel 2017. Fino alla fine del 2018 sono stati notificati complessivamente 138 casi di PSA nei cinghiali. Fino alla fine del 2020 sono stati notificati quasi 6000 casi di PSA nei cinghiali localizzati principalmente nelle regioni settentrionali e orientali del paese. (Sauter-Louis et al., 2021)

REPUBBLICA CECA

In Repubblica Ceca sono state riscontrate delle positività in due cinghiali nel giugno 2017 nel distretto di Zlín, nel quale viene creata una zona di quarantena con divieto di caccia. (Boklund et al., 2018)

Presumibilmente il virus è stato introdotto attraverso l'attività umana.

La genotipizzazione ha identificato il virus come simile a quelle varianti trovate nelle regioni orientali e sudorientali dell'UE (Moldavia, 2016; Ucraina, 2012 e 2015; Bielorussia, 2013)

La PSA è rimasta limitata al distretto di Zlín, in cui è stata definita un'area centrale di restrizione di circa 58 km². In quest'area centrale il 71,7% delle carcasse di cinghiali campionate erano positive alla PSA da giugno 2017 ad aprile 2018. Fino ad aprile 2018, quando è stato trovato l'ultimo cinghiale positivo alla PSA, sono stati rilevati complessivamente 230 casi di malattia, di cui 212 notificati nei cinghiali trovati morti e 18 nei cinghiali cacciati. Ciò sottolinea nuovamente l'importante ruolo della sorveglianza passiva nella diagnosi precoce della PSA. Gli ultimi cinghiali sieropositivi sono stati rinvenuti nella zona centrale nei mesi di luglio e ottobre 2018.

Un anno dopo il rilevamento dell'ultimo caso di cinghiale positivo alla PSA la Repubblica Ceca ha

presentato all'Organizzazione Mondiale per la Salute Animale (OIE) un'autodichiarazione di indennità dalla PSA.

Solo i cacciatori che avevano ricevuto una formazione in tema di biosicurezza erano autorizzati a cacciare. Fino al 31 ottobre 2018 sono stati registrati 230 casi di cinghiali infettati nel paese grazie alle limitazioni messe in atto. È stato posto divieto di alimentare i cinghiali, sono state installate dighe e recinzioni elettriche, sono stati effettuati svariati controlli nelle aziende in tema di biosicurezza. (Boklund et al., 2018) La Repubblica Ceca ha raggiunto lo stato di indennità nell'aprile 2018. (Baños et al., 2022)

Dopo più di 4 anni è stato rilevato un nuovo focolaio il 27 novembre 2022 a Jindřichovice pod Smrkem. Hanno fatto seguito tre nuovi focolai: il primo il giorno 1 gennaio 2023 a Nové Město pod Smrkem, il secondo il 6 febbraio 2023 a Horní Řasnice e il terzo a Ludvíkov pod Smrkem. Tutti i casi sono stati rilevati nei cinghiali selvatici e non ci sono stati casi nei suini domestici. (State Veterinary Administration, 2023)

Le misure adottate sono state eseguite in conformità al Regolamento Delegato (UE) 2020/687 della Commissione del 17 dicembre 2019 che integra il Regolamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo e del Consiglio per quanto riguarda le norme relative alla prevenzione e al controllo di determinate malattie elencate. Queste normative sono in vigore in tutto il territorio UE.

ROMANIA

Nel luglio del 2017 il virus arriva in Romania con due focolai nella contea di Satu Mare che hanno interessato i suini domestici. Poco dopo è stata ricevuta la conferma del primo caso di infezione anche nei cinghiali nella contea di Tulcea. È possibile che le dinamiche di infezione all'interno di queste due aree siano state differenti, la trasmissione potrebbe essere avvenuta a causa della presenza di insetti emopoiетici vettori (zanzare o mosche) o a causa delle condizioni meteorologiche. Fino alla fine del 2020 sono stati notificati quasi 1800 casi di PSA nei cinghiali. La situazione della PSA in Romania è dominata da focolai negli allevamenti di suini domestici di tutte le dimensioni, per cui le infezioni nei cinghiali potrebbero effettivamente rappresentare eventi di ricaduta dal settore dei suini domestici (Anette et al., 2020).

Gli isolati virali individuati in Romania appartengono al genotipo II. L'aumento del numero dei focolai nel paese e più in generale in Unione Europea ha reso purtroppo difficile identificare le

rotte spazio-temporali dei virus responsabili dei diversi casi. Sono necessari altri studi di genotipizzazione, sequenziamento e studi filogenetici per confermare i dati epidemiologici in maniera più accurata a livello globale. (Ungur et al., 2021)

La situazione si presenta diversa rispetto agli altri paesi perché in Romania i focolai riguardanti i suini domestici sono stati ben maggiori di quelli riguardanti i cinghiali e la maggior parte dei casi sono stati riscontrati vicino al fiume Danubio. La PSA si è diffusa soprattutto alle regioni nordoccidentali e sudorientali della Romania. (Boklund et al., 2018)

Questa situazione epidemiologica potrebbe essere stata influenzata dal sistema di allevamento estensivo tradizionale rumeno che è rappresentato da fattorie allestite all'interno dei cortili, con condizioni di alimentazione dei suini, stabulazione e irrigazione tipiche del paese. Secondo la legislazione rumena gli allevamenti da cortile sono classificati di tipo A mentre gli allevamenti commerciali di tipo B, con differenti norme di biosicurezza e in numero nettamente inferiore rispetto ai primi. (Boklund et al., 2020)

Nel luglio 2018 sono iniziati i lavori di costruzione di una recinzione tra il confine della Bulgaria e quello della Romania. (Boklund et al., 2018)

BULGARIA

Nell'agosto dello stesso anno sono stati confermati i primi casi di PSA anche in Bulgaria in un piccolo allevamento di 7 suini a Tutrakantsi nella regione di Varna, a 100 km dalla Romania.

Un interessante studio di Zani et al. sul primo focolaio registrato a Varna offre un modello di comprensione delle caratteristiche peculiari del sistema di allevamento bulgaro e dimostra come le misure di sicurezza possano risultare efficaci nel contrastare la diffusione della malattia, anche se applicate su bassa scala in allevamenti da cortile. (Zani et al., 2019)

Gli allevamenti da cortile sono comuni nelle aree rurali di molti paesi del mondo costituendo in molti casi l'unica fonte di approvvigionamento di carne per la popolazione locale e fornendo sostegno all'economia. In Bulgaria il 96% degli allevamenti suini sono classificati da cortile (con non più di 10 suini) (Martínez-López et al., 2014) comprendendo il 34% della popolazione di suini domestici totale (Alexandrov T. et al., 2011).

L'azienda indagata nello studio di Zani si trova in un piccolo villaggio di 120 famiglie la metà delle quali alleva suini nei cortili. A seguito della conferma dell'infezione da parte del laboratorio ufficiale UE a Madrid sono state applicate le misure di controllo indicate dalla

legislazione UE. Sono stati abbattuti tutti i suini domestici nel villaggio poiché nessuno degli allevamenti era registrato e nessuno degli allevatori ha ricevuto un risarcimento come sarebbe previsto dalla legge, comportando una perdita economica rilevante. Questo fattore ha contribuito allo sviluppo di un sentimento di scoraggiamento da parte degli allevatori, che hanno rinunciato a denunciare i casi sospetti, ricorrendo anche a macellazioni di emergenza illegali. La carne proveniente da questo tipo di traffico viene venduta ad un prezzo inferiore, utilizzata anche come alimento per gli animali in altri allevamenti. Secondo la normativa europea è vietato utilizzare i rifiuti alimentari come cibo per gli animali allevati, purtroppo questa è una pratica ancora comune nelle piccole realtà rurali.

In Bulgaria è stata effettuata la sepoltura delle carcasse infette in una fossa a norma, come raccomandato dal Ministero dell'Ambiente bulgaro, le stalle e le strade sono state disinfettate dalle autorità competenti, così come i veicoli e le attrezzature utilizzate. È stata allestita una zona di restrizione di 10 km dal focolaio e sono stati campionati i suini all'interno della stessa, risultando tutti negativi a qPCR ed ELISA. È stato ricordato a tutti i proprietari di registrare le aziende e applicare le norme di biosicurezza di base. Gli allevatori nelle zone di restrizione sono stati obbligati a denunciare alle autorità la presenza di suini infetti morti. I cacciatori erano obbligati a campionare i cinghiali nella stessa area e denunciare i risultati alle autorità, non era consentito venderne la carne o spostarla fino all'ottenimento del risultato negativo del test.

Il sequenziamento del genoma dell'isolato ha portato a identificare il ceppo Bulgaria 2018/1, con un'identità del 99,9% con le sequenze virali degli isolati provenienti dall'Europa orientale (ASFV Moldova 2017/1, LR722599.1; ASFV Repubblica Ceca 2017/1, LR722600.1), dell'Europa occidentale (ASFV Belgio 2018/1, LR536725.1) e dell'Asia (ASFV Cina/2018/AnhuiXCGQ, MK128995).

Non si hanno informazioni aggiuntive sull'origine del virus ma si sospetta che uno dei fattori di rischio maggiore sia quello umano tramite contatto diretto o indiretto con materiali infetti. Il fattore antropogenico è il più rilevante nella diffusione di PSA in Europa orientale. (V. R. Brown & Bevins, 2018)

Non ci sono state evidenze di coinvolgimento dei cinghiali come veicolo di diffusione di ASFV, ma il 13 febbraio 2019 è stato rilevato il primo caso in un cinghiale morto a 15 km dall'allevamento di Varna. Il virus potrebbe essere rimasto nell'ambiente o nei reservoir dal 2018 ma al tempo non sono stati effettuati campionamenti sui cinghiali. (Zani et al., 2019)

Dal 2019 ad oggi la PSA risulta endemica nel paese sia tra i cinghiali selvatici che tra i suini domestici. Da questa analisi emerge sicuramente come il controllo della diffusione delle malattie infettive in territori con questa tipologia di allevamento sia più difficoltoso di quello che si può ottenere in un allevamento commerciale, poiché esistono svariati fattori e misure di contenimento da mettere in atto, che devono essere adattate alle condizioni locali e sociali.

La legislazione per il controllo della PSA si rivolge soprattutto alle aziende agricole commerciali spesso ignorando le esigenze del settore di allevamento rurale.

Nel caso del primo focolaio bulgaro è peculiare considerare come l'intero villaggio costituisca l'unità epidemiologica di studio e coerentemente a questa valutazione l'abbattimento è stato imposto come misura preventiva a tutti i suini presenti. (Zani et al., 2019)

Questo studio costituisce anche la dimostrazione di come attraverso il rispetto e l'applicazione delle misure di biosicurezza imposte dalla legge sia possibile arginare la diffusione del virus.

D'altra parte emerge come sia necessario implementare e modulare l'intervento legislativo sulla base delle peculiarità dei sistemi tradizionali locali. Le aziende agricole spesso non sono registrate ciò comporta da un lato il fatto che gli allevatori non siano identificabili, dall'altro il fatto che, nei casi di PSA, non potrebbero ricevere alcun indennizzo per le perdite registrate.

Se gli allevatori volessero ripopolare le stalle dovrebbero essere incoraggiati a registrare la propria azienda e l'atto di registrazione dovrebbe includere tra le clausole l'adozione di misure di base di biosicurezza. (Zani et al., 2019)

La situazione incerta riguardo alla popolazione locale di cinghiali suggerisce anche l'importanza dell'applicazione di misure di sorveglianza passiva, con campionamento dei cinghiali selvatici adulti. (Boklund et al., 2018)

Un ulteriore accorgimento riguarda l'attività di informazione rivolta agli allevatori per spiegare le caratteristiche della malattia. Gli allevatori rurali spesso somministrano ai suini prodotti delle colture provenienti da campi circostanti e potenzialmente contaminabili da cinghiali infetti. Se ci fosse una maggiore informazione riguardo allo stato di diffusione della PSA nei cinghiali selvatici potrebbero essere implementate anche le misure di decontaminazione dell'alimento. (Zani et al., 2019)

MOLDAVIA

Nel luglio 2018 è stata segnalata un focolaio anche in Moldavia: sono stati colpiti due allevamenti a Donduseni. Si ritiene che la causa sia da ricercare nell'alimentazione dei suini con rifiuti contaminati. (Boklund et al., 2018) L'attenzione è rimasta alta a causa di focolai ancora presenti in Romania e Ucraina. In accordo con la legislazione in vigore sono stati effettuati dei monitoraggi della popolazione di cinghiali selvatici per i successivi 24 mesi, rilevando un totale di 8 cinghiali selvatici infetti nell'area di Lipcani (Briceni), nel nord-ovest del paese, vicino al confine con la Romania. Dopo mesi senza aver rilevato la malattia a marzo 2019 le autorità veterinarie moldave hanno confermato un nuovo focolaio in suini ad uso familiare all'aperto. Ad oggi la malattia è ancora presente. (3tre3, 2019)

REPUBBLICA SLOVACCA

Nella Repubblica Slovacca i primi casi di PSA nei cinghiali sono stati segnalati nell'agosto 2019 nel sud del paese, mentre focolai nei suini domestici erano stati segnalati vicino al confine con l'Ungheria nel luglio 2019. Nel 2019 sono stati segnalati anche 27 casi di PSA nei cinghiali, che sono diventati quasi 400 nel 2020. L'area interessata dai focolai è vicina a una regione nel nord dell'Ungheria in cui la PSA è stata rilevata per la prima volta nei cinghiali nell'aprile 2018 e da cui da allora la malattia si è diffusa e ha continuato a diffondersi. (Sauter-Louis et al., 2021)

SERBIA

La Serbia ha segnalato il primo focolaio di PSA nei suini domestici nell'agosto 2019 e i primi casi di PSA nei cinghiali vicino al confine con la Bulgaria nel gennaio 2020. Fino alla fine del 2020 sono stati notificati in totale 69 casi di PSA nei cinghiali. (Sauter-Louis et al., 2021)

BELGIO

Il Belgio ha dichiarato i suoi primi casi riscontrati nei cinghiali selvatici nel settembre 2018. (Linden et al., 2019) Il virus appartenente al genotipo II è stato isolato nella parte meridionale del paese (Gaume, vicino alla città di Etalle, regione di Vallonia).

La sequenza genomica completa del virus Belgium/Etalle/wb/2018 è disponibile su GenBank (#MK543947) e l'analisi comparativa ha dimostrato omologie con ceppi circolanti nell'Europa orientale. (Gilliaux et al., 2019)

L'epidemia tra i cinghiali è probabilmente dovuta ad un fattore antropocentrico poiché all'epoca la zona infetta più vicina al focolaio era in Repubblica Ceca, a circa 100 km di distanza.

Nell'ottobre dello stesso anno furono notificati 132 casi nei cinghiali, nessun caso tra i suini domestici.

A seguito dello scoppio del primo focolaio il Belgio ha immediatamente implementato una serie di misure preventive e di controllo per rallentare la diffusione virale, durante quel periodo non è mai stato rilevato alcun caso nei suini domestici nel paese. Dopo 26 mesi nel novembre 2020 il Belgio ha riacquisito lo stato di indennità da PSA a livello di Unione Europea, status approvato nel dicembre 2020 anche da WOAH.

Le misure messe in atto per arrestare la diffusione del virus sono presentate nello studio di Licoppe et al. e prevedevano la creazione di zone di restrizione, la ricerca attiva delle carcasse di cinghiali e la loro rimozione, la costruzione di recinzioni di filo metallico (per 277 km) e lo spopolamento dei cinghiali nella zona infetta. (Licoppe et al., 2023)

La regione di Gaume, situata a sud-est del Belgio, ai confini con Francia e Lussemburgo, è stata oggetto di zonazione per il controllo della PSA dal settembre 2018. Nel febbraio 2019 anche il massiccio delle Ardenne belghe situato appena a nord è risultato positivo al virus.

Dal 13 settembre 2018 un totale di 833 cinghiali sono risultati positivi al virus della PSA in Belgio. L'ultimo caso positivo confermato su una carcassa fresca di cinghiale risale all'11 agosto 2019. (Belgian Federal Agency for the Safety of the Food Chain (FASFC), n.d.)

La ricerca delle carcasse di cinghiali è stata intensificata dall'inizio dell'autunno 2019.

I 6 casi individuati dopo l'11 agosto 2019 sono stati tutti riscontrati nei resti (solo ossa) di cinghiale. Le ossa di cinghiale al momento del ritrovamento erano secche, l'età delle ossa è stata valutata testando il DNA residuo e i risultati dell'analisi eseguita da NRL hanno indicato che i cinghiali da cui provenivano erano morti diversi mesi prima. Questi dati confermano l'efficacia delle misure di restrizione attuate all'interno del Paese.

Nel novembre 2018 sono state istituite in Belgio le zone regolamentate europee: zona I (zona cuscinetto) e zona II (zona infetta). Le zone interessate dall'epidemia di PSA occupavano un piccolo territorio nel sud del Belgio.

Sono stati presi in considerazione vari criteri prima di prendere la decisione di ridurre le dimensioni della zona II:

- L'ultimo caso positivo era datato 17 febbraio 2019
- Gli sforzi della sorveglianza passiva e attiva erano stati mantenuti e tutti i cinghiali ritrovati morti o abbattuti erano stati testati risultando negativi
- Nessun suino domestico era presente nell'area della zona II, poiché tutte le aziende erano state spopolate nel settembre del 2018 e da allora non vi era più stato ripopolamento.

La fonte del virus della PSA introdotto sul territorio belga rimane sconosciuta e sotto investigazione. L'attività umana può essere coinvolta, poiché le caratteristiche genetiche del ceppo identificato indicano un'origine da territori dell'Europa Orientale.

La malattia in Belgio è rimasta strettamente limitata ai cinghiali. Finora il virus non è stato trovato nei suini domestici né nei suini selvatici in cattività: il Belgio resta quindi esente dalla malattia nei suini domestici. Questo status è certificato da un'autodichiarazione sottoscritta dall'OIE nel 2019.

È interessante analizzare la strategia messa in atto dal Belgio per raggiungere tali risultati. L'obiettivo del piano attuato era limitare il più possibile la diffusione del virus tra i cinghiali selvatici e prevenirne la trasmissione ai suini domestici, in accordo con la normativa Europea.

Nell'attuazione delle misure sono state coinvolte la FASFC – Federal Agency for the Safety of the Food Chain (responsabile per l'attuazione delle misure nei suini domestici e cinghiali in cattività) e le autorità regionali (una per la regione di Vallonia, una per le Fiandre e una per Bruxelles, responsabili dell'attuazione delle misure nei cinghiali selvatici e nelle attività di caccia). (Belgian Federal Agency for the Safety of the Food Chain (FASFC), n.d.)

La zonizzazione del territorio belga è avvenuta secondo la normativa vigente in Europa.

A seguito della prima conferma di ASFV nei cinghiali è stata delimitata una prima "zona infetta" di 63000 ettari, in accordo con l'articolo 15 della Direttiva 2002/60/CE del Consiglio del 27 giugno 2002 che presentava disposizioni specifiche per il controllo della PSA.

Dopo due mesi questa "zona infetta" provvisoria è stata sostituita da due zone regolamentari, che sono state delimitate in accordo con i "principi e i criteri per la regionalizzazione geografica della PSA" attuati dall'UE (documento di lavoro SANTE/7112/2015/rev.3 della Commissione UE e la Decisione attuativa della Commissione 2014/709/UE e successive modifiche).

I principi della zonizzazione erano in linea con il capitolo 4.3 dell'OIE contenuto nel Terrestrial Animal Health Code. Sono state definite due zone regolamentate differenti:

- Zona I: zona circostante alla zona II che è considerata a rischio più alto. In questa zona non erano presenti casi e non erano stati identificati focolai di ASFV, è stata adottata una sorveglianza maggiore (in particolare sorveglianza passiva); la zona I è equivalente alla zona di protezione (buffer zone) descritta nel Terrestrial Animal Health Code;
- Zona II: zona in cui il virus era stato identificato solo nei cinghiali selvatici. La zona II equivale alla zona infetta descritta nel Terrestrial Animal Health Code.

Le zone sono state regolarmente adattate sulla base delle evoluzioni riscontrate nella diffusione della PSA tra i cinghiali selvatici. Per lungo tempo i nuovi casi sono stati rintracciati solo nella zona II e I (vicino al confine con la II), ciò dimostra che l'applicazione dei principi della zonizzazione sia importante e che la zona I funzioni effettivamente come un cuscinetto.

L'autorità regionale per la Vallonia ha delimitato e ampliato ulteriormente le proprie zone per facilitare i propri fini operativi:

- Una "zona nocciolo" (kernel zone) e una "zona cuscinetto" (buffer zone) che corrispondono grosso modo alla zona II;
- Una "zona di osservazione rafforzata" e una "zona di vigilanza rafforzata" che corrispondono grosso modo alla zona I.

Da luglio 2019 la "kernel zone" e la "buffer zone" sono confluite in un'unica zona denominata "zona infetta" che corrisponde alla zona II.

Questa ulteriore zonizzazione è stata necessaria a facilitare la gestione operativa delle attività legate alla fauna selvatica (monitoraggio, ricerca e distruzione di carcasse di cinghiali, caccia) e alle foreste (attività professionali e turismo). Anche i confini di questa zona sono stati regolarmente riadattati per seguire l'evoluzione e la diffusione della malattia nel cinghiale.

Le autorità regionali erano competenti per il rafforzamento delle misure che riguardavano i cinghiali selvatici. Le misure messe in atto nella zona infetta e nella zona di osservazione e vigilanza prevedevano: divieto di tagliare legname (salvo deroghe), limitazione della circolazione umana nelle foreste, divieto di nutrire i cinghiali selvatici, regolamentazione della caccia, rafforzamento della sorveglianza passiva (ricerca attiva di cinghiali deceduti, le cui carcasse sono testate verso ASFV), installazione di reti di recinzioni che delimitano le zone regolamentate.

Sono stati istituiti tre centri specifici per la movimentazione e lo smaltimento di cinghiali trovati morti o abbattuti nelle quattro zone (nocciolo, cuscinetto, osservazione e vigilanza rafforzata). In questi centri venivano effettuati test per il rilevamento di ASFV.

Nel resto delle regioni non interessate direttamente dalla zonizzazione le misure messe in atto sono state differenti, riguardavano per lo più la sensibilizzazione dei cacciatori e dei visitatori delle foreste alla tematica PSA, la sorveglianza passiva, la riduzione della popolazione di cinghiali attraverso la caccia (con obiettivo del 150% rispetto agli abbattimenti del 2017).

Le stesse misure sono state introdotte anche nelle regioni delle Fiandre e Bruxelles.

Le misure preventive che riguardavano i suini domestici e i cinghiali in cattività sono state implementate dall'agenzia Federale per la Sicurezza della Catena Alimentare (FASFC). Sono state messe in atto misure generali come: divieto di accesso in allevamento alle persone che erano entrate in contatto con la fauna selvatica nelle 48 ore precedenti, divieto di introduzione di cinghiali o parti delle loro carcasse in allevamenti suinicoli, divieto di alimentare gli animali con rifiuti, attuazione di misure di biosicurezza, divieto di movimentazione dei suini (soggetto a deroghe), pulizia e disinfezione obbligatorie di abiti e veicoli per il trasporto di suini, notifica obbligatoria alla FASFC se fossero stati rilevati segni clinici sospetti nei suini.

Il Decreto Ministeriale del 26 settembre 2018 ha imposto anche l'abbattimento preventivo di tutti i suini domestici e dei cinghiali in cattività presenti nella "zona infetta" provvisoria che era stata inizialmente delimitata in seguito alla prima conferma di PSA nei cinghiali. Questo provvedimento è stato seguito da un divieto di ripopolare le fattorie in cui sono stati abbattuti i suini. La misura ha portato all'abbattimento preventivo di un totale di 5222 suini.

Questo abbattimento preventivo è stato una misura una tantum; non si è ripetuto in seguito, né quando la "zona infetta" provvisoria iniziale è stata sostituita dalle zone I e II leggermente più grandi, né quando queste zone furono ulteriormente estese. Come indicato precedentemente la densità dei suini domestici e delle aziende nella zona I e nella zona II era molto bassa e anche il rischio di trasmissione della PSA dai cinghiali selvatici ad uno dei pochi allevamenti al momento presenti nelle zone è stato stimato molto basso.

Il Decreto ministeriale del 26 settembre 2018 ha proibito inoltre il trattamento medico dei suini malati con sintomi simili a quelli da PSA almeno finché non fossero stati testati per ASFV. Questo provvedimento era valido in tutti gli allevamenti di suini e ha consentito a FASFC di

ottenere campioni di animali provenienti da tutto il Belgio e controllare ogni possibile caso di diffusione di PSA.

Secondo la normativa applicabile (articoli 2, 3 e 8 della Decisione 2014/709) i suini vivi sono stati sottoposti anche a limitazioni nelle movimentazioni differenti a seconda che la loro provenienza fosse la zona I o la zona II.

Hanno mostrato particolare importanza anche le azioni di sorveglianza passiva e attiva sia nei soggetti selvatici che nei suini domestici e cinghiali in cattività. Soprattutto nella regione di Vallonia è stata implementata l'attività di ricerca attiva quotidiana di carcasse di cinghiali che venivano prelevate e testate verso ASFV. Anche la sorveglianza attiva è stata implementata nelle zone delimitate promuovendo la ricerca del virus in soggetti appositamente abbattuti.

L'applicazione immediata di questa serie di norme e misure di biosicurezza ha consentito al Belgio di conservare uno status di indennità nella popolazione di suini domestici e garantire così la sicurezza dei prodotti di derivazione suina. La zonizzazione del resto del territorio ha facilitato l'attuazione di misure di controllo per limitare la diffusione della malattia nel breve periodo ed eradicarla nel lungo periodo. Sono stati identificati nuovi casi nei cinghiali selvatici solo nelle aree già regolamentare e non al di fuori di esse.

L'obiettivo principale era rappresentato dal controllo delle popolazioni di cinghiali infetti per poter eradicare la patologia. Fu preso come esempio il modello di intervento di successo della Repubblica Ceca e abbinato alle raccomandazioni di EFSA e alle relazioni di veterinari esperti del Belgio EUVet. (More et al., 2018)

POLONIA

La notizia dei focolai di PSA notificati nei paesi dell'Europa orientale ha spinto la Polonia all'attuazione di campagne e programmi di prevenzione. Il monitoraggio del virus della PSA è iniziato già nel 2011 in questo Paese. Le attività di monitoraggio sono state condotte in un'area di confine larga 40 km (lungo il confine con l'Oblast di Kaliningrad) e lungo il confine orientale con Ucraina, Bielorussia e Lituania, coprendo parti del Voivodati di Warmińsko–Mazurskie, Podlaskie, Lubelskie, Mazowieckie e Podkarpackie. Nel corso di due anni sono stati raccolti e testati nelle zone designate 15.187 campioni provenienti da cinghiali; tutti i campioni sono risultati negativi per la ricerca di ASFV. (Kruszyński et al., 2023)

Al fine di aumentare la conoscenza del rischio di diffusione della PSA nel territorio polacco, nel 2013 sono state effettuate simulazioni dell'epidemia. Lo scopo era testare le procedure da mettere eventualmente in atto e valutare la coordinazione tra il Responsabile Veterinario e gli Ispettorati Veterinari provinciali e distrettuali, nonché il Ministro dell'Agricoltura e dello Sviluppo Rurale in caso di epidemia da PSA (Cwynar et al., 2019; Kruszyński et al., 2023; "Scientific Opinion on African Swine Fever," 2014).

Il primo caso di PSA in Polonia è stato confermato nella seconda metà di febbraio 2014 dall'Istituto Statale di Ricerca Veterinaria di Puławy (laboratorio nazionale di riferimento).

Il campione di DNA proveniva dalla carcassa di un cinghiale trovata vicino al villaggio di Grzybowski, nel Voivodato di Podlaskie, a circa 900 metri dal confine con la Bielorussia.

Il secondo caso di PSA in Polonia è stato riscontrato il 17 febbraio 2014 in una carcassa di cinghiale identificata vicino al villaggio di Kruszyniany, nel Voivodato di Podlaskie, sempre in prossimità del confine con la Bielorussia. La distanza tra questi due casi era di circa 15 km (Cwynar et al., 2019; Z. Pejsak et al., 2014; Woźniakowski et al., 2016).

Fino all'11 settembre 2014 sono stati confermati 14 focolai di PSA nei cinghiali in 4 comuni del Voivodato di Podlaskie, nei distretti di Sokółka e nella contea di Białystok. La distanza che separava i luoghi in cui sono stati trovati i cinghiali al confine con la Bielorussia non era superiore a 9 km. È stato confermato che il ceppo del virus isolato da questi casi apparteneva al genotipo II con elevata affinità con un ceppo circolante nei territori bielorusso, ucraino e lituano (Woźniakowski et al., 2021).

Inizialmente nel 2014 il tasso di diffusione del virus della PSA era relativamente basso tra la popolazione di cinghiali. Nel 2016 la malattia si stava diffondendo lentamente ma in modo coerente in tutto il paese coprendo a sua volta altri due Voivodati orientali – Podlaskie e Lubelskie – e la Mazovia, situata in posizione centrale. La comparsa della PSA nel territorio della Mazovia ad una distanza di almeno 100 km dai focolai più vicini di PSA nei cinghiali è molto probabilmente dovuta all'attività umana (Hawes et al., 2008). La mancanza di controlli adeguati nel trasporto di suini, legale e non legale, è stata una delle cause che hanno comportato un'ulteriore diffusione del virus su lunghe distanze. (Kruszyński et al., 2023)

Alla fine del 2017 vicino a Varsavia e Piaseczno, a più di 100 km dalle zone soggette a restrizioni, è scoppiata un'epidemia di PSA nei cinghiali nella Polonia orientale probabilmente anche in

questo caso dovuta all'intervento dell'uomo. L'attraversamento del confine naturale (il fiume Vistola) da parte dell'epidemia è stato testimoniato dalla conferma di un altro caso positivo nel novembre di quell'anno: una carcassa di cinghiale trovata nel distretto orientale di Varsavia nel comune di Izabelin. Successivamente sono stati segnalati ulteriori focolai di PSA tra i cinghiali a Piaseczno, Nowy Dwór Mazowiecki e nella capitale Varsavia. (Kruszyński et al., 2023)

Nel 2018, la malattia ha attraversato il confine settentrionale delle province di Varmia-Masuria e Precarpazi (Juszkiewicz et al., 2023). Nel 2019 si è assistito ad un aumento della sorveglianza passiva e attiva che ha incluso un incremento delle attività di caccia in tre voivodati: Lubuskie, Wielkopolska e Bassa Slesia. Quell'anno ha mostrato un aumento dei focolai di PSA e ha delineato una rotta di diffusione del virus anche nella parte occidentale della Polonia (Kruszyński et al., 2023).

Si stima che, nel 2019, 5 anni dopo l'individuazione del primo focolaio di PSA nei cinghiali, quasi il 25% del territorio del paese era occupato da zone infette (Juszkiewicz et al., 2023; Z. , Pejsak et al., 2018).

Nel 2020 i primi focolai di PSA nei cinghiali sono stati rilevati in due province (voivodati di Pomorskie e Zachodniopomorskie) in cui la PSA non si era mai verificata in precedenza.

La rapida diffusione della malattia in territori indenni del Paese è stata associata ad un raddoppio del numero di focolai confermati nei cinghiali rispetto al 2019 e rintracciati attraverso la sorveglianza passiva. (Kruszyński et al., 2023)

Il virus della PSA nel 2020 è stato identificato anche negli allevamenti di suini nei Voivodati di Lubuskie, Dolnośląskie e Wielkopolskie, causando enormi perdite economiche nella produzione suinicola polacca. All'epoca a livello nazionale furono segnalati 104 focolai di PSA tra i suini, di cui sei focolai nei suini nella Wielkopolska, quattro nel Voivodato di Lubuskie e due nel Voivodato di Dolnośląskie. Molto probabilmente anche in questo caso il vettore è stato l'uomo. Il 2021 è stato un anno record per i focolai di PSA negli allevamenti di suini mentre sono stati segnalati meno focolai nei cinghiali rispetto al 2020. (Kruszyński et al., 2023)

Il numero di focolai è gradualmente aumentato e ha raggiunto i massimi per i cinghiali e i suini rispettivamente nel 2020 e nel 2021 ma successivamente sono stati osservati alcuni cali (Boklund et al., 2018; Walczak et al., 2020).

Dall'inizio dell'epidemia in Polonia nel 2014 fino alla fine del 2022 sono stati confermati un totale di 502 focolai negli allevamenti di suini e 15.307 casi nei cinghiali (Figura 3) (Juszkiewicz

et al., 2023). Nonostante l'implementazione di significative restrizioni e misure di biosicurezza nell'allevamento di suini la malattia ha continuato a diffondersi e rappresenta un rischio reale per la produzione suinicola.

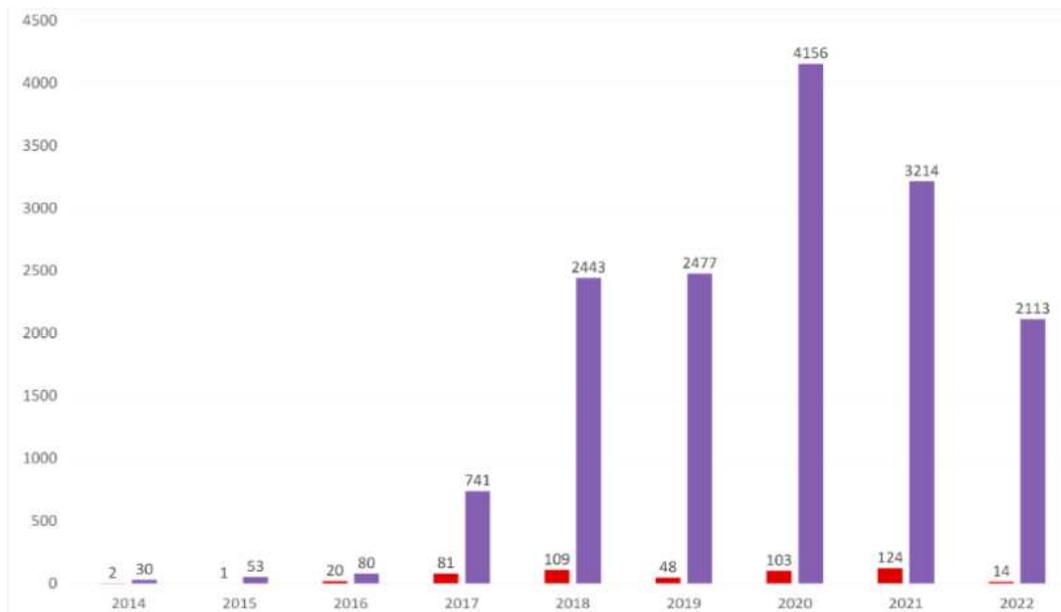


Figura 4: casi di ASFV segnalati in Polonia tra il 2014 e il 2022. In rosso i casi segnalati tra i suini domestici, in viola i casi rilevati nella popolazione di cinghiali selvatici. (Juszkiewicz et al., 2023).

Il 2022 è stato un anno caratterizzato da un calo significativo dei focolai di PSA in tutta l'Unione Europea. Nell'UE sono stati registrati 7.282 casi di PSA nei cinghiali con una diminuzione del 40% rispetto al 2021. La Polonia ha registrato il numero più alto di focolai di PSA nei cinghiali in tutta l'UE (2.152 focolai). Si è verificato un calo del 33% su base annua. Il maggior numero di casi positivi tra i cinghiali è stato registrato nei Voivodati di Dolnośląskie, Lubuskie, Warmińsko-Mazurskie e Wielkopolskie.

La Germania si è classificata subito dopo la Polonia con 1.628 focolai di PSA nei cinghiali, seguita da Lettonia, Ungheria e Slovacchia. Nel 2022, nella Repubblica Ceca, dopo 4 anni senza la presenza della malattia, l'infezione da PSA è stata confermata in un suinetto morto trovato vicino al confine con la Polonia. Allo stesso modo, nell'Unione Europea è stata segnalata una diminuzione di quasi l'80% dei focolai di PSA nei suini domestici. Il maggior numero di focolai nei suini è stato registrato in Romania (316), Serbia (103) e Macedonia del Nord (30).

La Polonia nel 2022 ha confermato 14 focolai di PSA tra i suini domestici in 5 Voivodati, con una diminuzione dell'89% rispetto al 2021. Il numero più alto di casi nel 2022 è stato segnalato nel

Voivodato della Grande Polonia, gli altri Voivodati in cui sono stati annunciati focolai tra i suini includevano Zachodniopomorskie, Lubuskie, Dolnośląskie e Warmińsko–Mazurskie.

Al 25 ottobre 2023 la Polonia ha 2.289 focolai di PSA nei cinghiali; rispetto ad altri paesi europei, confermando il maggior numero di focolai di PSA nei cinghiali di quell'anno. (Ståhl et al., 2023)

Altri paesi in Europa in cui si registrano ancora numerosi casi di PSA nei cinghiali sono Germania, Italia e Slovacchia.

La Polonia è un Paese che lotta ancora con il problema della PSA. Una parte significativa del Paese è ancora indenne dal virus (Bocian et al., 2022; Gervasi et al., 2019) quindi è importante adottare misure attive per prevenire la diffusione della malattia, come il monitoraggio della popolazione di cinghiali, il rispetto delle misure di biosicurezza, l'uso di disinfettanti negli allevamenti suini ma anche la sensibilizzazione della popolazione, dei veterinari e dei dipendenti degli allevamenti verso la lotta contro la PSA.

I cinghiali sono il vettore principale del virus nell'ambiente naturale quindi le migrazioni di questi animali possono avere un ruolo significativo nella diffusione del virus a distanza (Bocian et al., 2022). Secondo l'Autorità europea per la sicurezza alimentare (EFSA), la velocità media di trasmissione della PSA associata alla circolazione naturale del virus nelle popolazioni di cinghiali in Polonia e negli Stati baltici varia da 8 a 17 km all'anno (Bocian et al., 2022) . L'infezione virale in questi animali è influenzata dalla densità della popolazione e dalle dimensioni dei complessi forestali. La PSA si manifesta principalmente nei cinghiali nelle aree in cui la popolazione animale supera 1 animale/km². Si è giunti alla conclusione che ridurre la densità dei suini selvatici al di sotto dei valori sopra menzionati può limitare la diffusione della malattia (Gervasi & Guberti, 2021; More et al., 2018; Pepin et al., 2020). Tuttavia, secondo altri esperti, anche a basse densità di animali, cioè inferiori a 0,1 cinghiali/km², il virus della PSA può ancora diffondersi nell'ambiente attraverso le carcasse dei selvatici contaminate (M. C. Gallardo et al., 2015). Secondo l'EFSA, sono gli esseri umani a svolgere il ruolo più importante nella trasmissione della PSA. La loro attività potrebbe essere la ragione dell'introduzione del virus in altre aree e della diffusione della malattia su lunghe distanze (Gervasi et al., 2022; Mazur-Panasiuk et al., 2019). Le persone che utilizzano le aree forestali, ovvero gli habitat dei cinghiali infetti, possono causare la diffusione del virus poiché i loro vestiti o le loro calzature potrebbero esserne contaminati. L'alimentazione degli animali selvatici dovrebbe essere limitata nelle zone colpite.

Inoltre la caccia ai cinghiali come strumento per combattere la malattia può comportare il rischio potenziale di contaminare l'ambiente con questo virus. A sostegno di ciò si può confermare che in 10 contee della Polonia (Lubaczów, Parczew, Łosice, Bielsk podlaski, Lubartów, Mońki, Radzyń, Siemiatycze, Siedlce, Chełm), i focolai di PSA nei suini domestici si sono verificati prima che nella popolazione di cinghiali. Inoltre nelle contee di Zambrów e Wysokie Mazowieckie i focolai di PSA sono stati registrati solo negli allevamenti di suini (Kruszyński et al., 2023).

GERMANIA

Da quando è emersa la PSA nella Polonia occidentale nel novembre 2019 gli sforzi di sorveglianza, soprattutto quella passiva sui cinghiali, sono stati intensificati nelle regioni della Germania al confine con la Polonia. Il primo focolaio di PSA segnalato nella Polonia occidentale si è verificato a circa 79 km dal confine con la Germania, il che ha aumentato il rischio di introdurre la PSA in un paese vicino attraverso la migrazione di cinghiali infetti.

La Germania aveva introdotto misure preventive, incrementando il monitoraggio dei cinghiali e dei suini domestici e promuovendo la costruzione di una recinzione lungo il confine polacco per impedire la migrazione dei cinghiali nel Brandeburgo. Le misure adottate dalla Germania per prevenire la diffusione del virus non hanno avuto successo, dimostrando l'esistenza di una diffusione transfrontaliera che ha colpito la Polonia occidentale e la Germania stessa.

Il 10 settembre 2020 il ministro tedesco dell'Agricoltura ha confermato il primo caso di PSA in un cinghiale testato tramite sorveglianza passiva nel distretto di Spree-Neiße nel Brandeburgo. (Biondi et al., 2022; Gervasi et al., 2019; Nurmoja, Schulz, et al., 2017)

Un'analisi esaustiva del primo caso notificato è riportata da Sauter-Louis et al. (Sauter-Louis et al., 2021) Il caso più vicino di PSA nei cinghiali in Polonia era localizzato a 10,4 km dal confine tedesco (e confermato il 26 marzo 2020). A quel tempo la regione adiacente in Polonia era classificata come regione di zona I secondo la decisione di esecuzione UE 2014/709, cioè con un certo rischio per quanto riguarda la PSA a causa della prossimità dell'infezione con la popolazione selvatica. Dopo la comparsa della PSA nei cinghiali nella Polonia occidentale il rischio di introduzione del virus in Germania con la migrazione di cinghiali infetti è aumentato notevolmente. Sono state introdotte misure preventive tra cui la costruzione di una recinzione mobile lungo il confine polacco e un incremento della sorveglianza dei cinghiali e dei suini domestici. Sembra probabile che la malattia sia stata introdotta dalla migrazione dei cinghiali. (Un nuovo caso confermato il 30 settembre 2020, localizzato a circa 60 km a nord del focolaio

della prima introduzione in Germania, è stato rilevato a meno di 2 km dal confine con la Polonia.) Non si può escludere che le attività umane (come lo smaltimento non sicuro di materiale contaminato) potrebbero aver causato l'infezione iniziale. Nei giorni successivi è stata intensificata la ricerca delle carcasse e a soli 6 km di distanza dal primo sito sono stati rinvenute altre quattro carcasse positive ad ASFV ed è stato catturato un cinghiale braccato con segni clinici di malattia. Tra il 1° novembre 2019 e il 9 settembre 2020 sono stati segnalati un totale di 1.037 casi nei cinghiali e 8 focolai nei suini domestici, con zone di restrizione in Polonia che si estendevano fino al confine tedesco. L'analisi filogenetica della sequenza dell'intero genoma di ASFV proveniente dalla prima carcassa rilevata in Germania ha indicato che l'isolato si può raggruppare con il ceppo di genotipo II, comprese tutte le sequenze provenienti dall'Europa orientale, dall'Asia e dal Belgio. Tuttavia sono stati confermati alcuni marcatori genetici, inclusa una duplicazione ripetuta in tandem di 14 bp nel gene O174L, che sono stati rilevati solo in sequenze provenienti dalla Polonia (compresa la Polonia occidentale). (Sauter-Louis et al., 2021)

La maggior parte dei cinghiali testati per la PSA sono stati esaminati durante l'inverno quando la caccia è al suo momento massimo. Nei 4 mesi precedenti alla scoperta del primo caso di PSA in Germania sono risultati negativi alla ricerca di ASFV 50 carcasse di cinghiali, 12 cinghiali colpiti da arma da fuoco e 165 cinghiali uccisi in incidenti stradali. Sulla base dei dati disponibili il virus è stato introdotto in Germania probabilmente all'inizio di luglio 2020 o anche prima. Ad oggi non sono registrati focolai in Germania. (WOAH, 2024a)

NEL MONDO

Nell'agosto 2018 la PSA è stata segnalata per la prima volta nella Repubblica Popolare Cinese. Attraverso analisi molecolari è emerso che i genotipi degli isolati di ASFV provenienti da focolai diversi nella Cina fossero differenti tra loro. Ciò suggerisce che anche in questi casi l'origine dell'introduzione di ASFV sia da ricercare nel commercio e nel trasporto di mangimi contaminati. L'ipotesi sembra avvalorata dal ritrovamento di ASFV all'interno del mangime destinato ai suini o nei mangimi destinati ad altre popolazioni animali, nei cui ingredienti era presente sangue di maiale essiccato, probabilmente contaminato. (H.-J. Kim et al., 2020)

Alla fine di settembre 2019 la PSA è stata rilevata nei paesi vicini tra cui Mongolia, Vietnam, Cambogia, Repubblica Popolare Democratica di Corea (Corea del Nord), Repubblica

Democratica Popolare del Laos, Myanmar, Timor Est, Filippine, Repubblica di Corea (Corea del Sud) e Indonesia (Gaudreault et al., 2020)

Nel 2020 sono stati registrati i primi casi in Grecia (Brellou et al., 2021).

Nel giugno 2021 dopo più di 40 anni di assenza dei casi da ASFV genotipo II sono stati riportati in Repubblica Dominicana e Haiti, comportando una grave minaccia per la salute animale, per l'economia dei mercati di bestiame e per la sussistenza degli allevatori. (Jean-Pierre et al., 2022)

Analogamente nel gennaio 2022 anche l'Italia ha notificato la presenza di ASFV genotipo II inizialmente tra i cinghiali selvatici, dopo un'assenza di circa 40 anni. (Beato et al., 2022; Iscaro et al., 2022)

Altri due nuovi Paesi sono stati colpiti: la Macedonia del Nord e la Thailandia. In Macedonia del Nord il sistema di allevamento è prevalentemente su piccola scala con alti tassi di turn over e il territorio mostra una densità di cinghiali selvatici considerevole (O'Hara et al., 2021).

La Thailandia ha invece identificato casi di ASFV in suini vivi e carcasse infette, prodotti a base di carne suina, materiale seminale appartenente ai cinghiali, mangimi e fomiti contaminati (Thanapongtharm et al., 2022)

Il primo caso segnalato in Nepal è avvenuto nel marzo 2022 nonostante il governo avesse vietato l'importazione di suini domestici e di prodotti derivati dai paesi infetti da PSA fin dal 28 gennaio 2019. (Acharya & Wilson, 2020)

Nel 2023 i seguenti Paesi hanno rilevato la presenza di ASFV: Singapore (febbraio), Bosnia ed Erzegovina (giugno), Croazia (giugno), Svezia (agosto), Bangladesh (novembre). Il Montenegro ha riportato il suo primo caso nel gennaio 2024. (WOAH, 2024b)

CAPITOLO IV: ITALIA

In Italia oggi si assiste ad uno scenario complesso caratterizzato da una parte dalla gestione di una “strategia di uscita” per l’eradicazione del genotipo I di ASFV in Sardegna, dall’altra da nuove incursioni del genotipo II nell’Italia peninsulare.

Sulla base della valutazione dello scenario internazionale caratterizzato da diverse notifiche di PSA in paesi Europei ed extra Europei, a partire dal 2018 in Italia sono state messe in atto delle azioni necessarie a prevenire l’introduzione del virus nel territorio peninsulare e ad affrontare l’emergenza qualora si fosse verificata. Sono stati redatti il Piano di emergenza italiano, il manuale di emergenza per la PSA nei cinghiali e il manuale operativo per PSA e PSC nei suini domestici, come riportato da Pavone et al. (Pavone et al., 2023). Sono state condotte campagne di sensibilizzazione rivolte a tutte le parti interessate, oltre ad esercizi di simulazione sul campo o su carta del coordinamento di un focolaio e di risposta alle crisi. Queste attività hanno coinvolto le Autorità Sanitarie Pubbliche e i Servizi Veterinari e sono state svolte per implementare le aree di pianificazione e preparazione della risposta, monitoraggio, sorveglianza, gestione delle crisi e comunicazione dei rischi.

Nonostante gli sforzi nel 2022 è stata segnalata la presenza di ASFV di genotipo II in sei diverse regioni peninsulari mentre la regione Sardegna stava applicando la strategia di eradicazione per ottenere dall’UE lo status di indennità da PSA.

La prima incursione da parte del virus nella penisola italiana è avvenuta in Piemonte. Qui, come in tutti gli altri focolai successivi, l’infezione da ASFV è stata identificata per la prima volta nei cinghiali selvatici.

Negli ultimi decenni le popolazioni di cinghiali in Italia hanno subito una notevole espansione che ha portato alla colonizzazione di nuovi habitat come terreni agricoli e aree periurbane e urbane. L’Appennino italiano ha mostrato un’elevata popolazione di cinghiali che varia da 4 a 18 animali/Km² (Guerrasio et al., 2022). Uno studio più recente sulla distribuzione dei cinghiali dall’Europa occidentale all’Asia centro-settentrionale ha mostrato una grande varietà di densità di animali anche in Italia, da zero a più di dieci capi per km², a seconda delle caratteristiche del territorio e del suo stato di vegetazione (Pittiglio et al., 2018).

Attualmente in Italia coesistono differenti realtà:

- La protezione dei territori esenti da PSA, caratterizzati da grande biodiversità e proprie caratteristiche socio-culturali ed economiche;
- La gestione dell'epidemia di PSA in corso tra i cinghiali in contesti geografici complessi e la gestione dei focolai isolati nei suini domestici;
- La gestione dell'eradicazione della PSA dai territori in cui suini domestici e cinghiali convivono con animali da cortile e ruspanti illegali, e dove esistono forti connotazioni socio-culturali ed economiche locali (Sardegna).

L'esperienza italiana unica e complessa nel controllo della PSA potrebbe essere utile per aumentare il know-how sull'efficacia delle strategie e delle misure adottate, compresi aspetti e aree di miglioramento per combattere questa epidemia, come riporta Pavone et al.

NORD ITALIA: PIEMONTE-LIGURIA-LOMBARDIA

Il 5 gennaio 2022 è stato riportato il primo caso di ASFV nei cinghiali selvatici in Piemonte (Giammarioli et al., 2023). In ottemperanza a quanto previsto dal Piano Nazionale di Sorveglianza della PSA i Servizi Veterinari hanno prelevato dei campioni di tessuti da una carcassa di cinghiale nel comune di Ovada, in provincia di Alessandria, un piccolo centro della zona aspra e montuosa tra Piemonte e Liguria. L'individuazione della PSA mediante metodi molecolari è stata eseguita dal laboratorio regionale di Sanità Animale – l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta (IZSPLV) – ed è stata successivamente confermata dal Laboratorio Nazionale di Riferimento (NRL) per la PSA – l'Istituto Zooprofilattico dell'Umbria e delle Marche (IZSUM) — il 6 gennaio 2022.

Il test PCR in tempo reale e l'analisi di sequenziamento hanno confermato la circolazione del genotipo II del virus della PSA, filogeneticamente e strettamente correlato al ceppo presente contemporaneamente in Europa e Asia. Nei giorni successivi altri due casi positivi di PSA nei cinghiali sono stati rilevati a Fraconalto (provincia di Alessandria, Regione Piemonte) e Isola del Cantone (provincia di Genova, Regione Liguria) rispettivamente a circa 30 e 40 km dal primo caso. Trattandosi di un'epidemia in natura è stata organizzata una riunione d'emergenza del gruppo operativo di esperti per delimitare l'area infetta e delineare le misure straordinarie da attuare per limitare la diffusione della malattia. Sono state istituite due Unità di Crisi Regionali (RCU) per organizzare la ricerca di altre carcasse di cinghiali nel territorio, controllare gli allevamenti di suini nell'area infetta, gestire le attività venatorie, fornire piani operativi alle parti interessate e attuare eventuali altre misure richieste dalle norme comunitarie.

In particolare sono stati previsti un rafforzamento della sorveglianza passiva nel settore selvatico ed un aumento del livello di vigilanza sull'attuazione delle misure di biosicurezza nel settore domestico, con particolare attenzione alle operazioni di trasporto e movimentazione degli animali, dei loro mangimi, dei prodotti derivati dai suini e dalle persone. A livello comunitario, in applicazione del principio di regionalizzazione e sulla base del regolamento di esecuzione (UE) 2021/605 della Commissione allora applicabile, sono state definite le zone soggette a restrizioni di tipo I e II (zone di sorveglianza e zone infette) e sono state applicate delle limitazioni per gli spostamenti di suini e di prodotti da essi derivati in queste aree, con l'obiettivo di prevenire la diffusione della malattia al di fuori delle zone interessate.

Dato il complesso coinvolgimento biregionale nella diffusione della PSA per ottenere migliori risultati è stato nominato un Commissario Straordinario, con decreto del Presidente del Consiglio dei Ministri del 25 febbraio 2022, con il compito di coordinamento e monitoraggio delle azioni e delle misure da mettere in atto e, quando necessario, con l'incarico di emanare ordinanze con effetto immediato riguardo a gestione e contenimento dell'epidemia. Tra le decisioni di questo ente sono stati condotti una stima della densità locale di cinghiali (molto elevata nelle zone interessate, da 60.000 capi in Liguria a 85.000 in Piemonte) e uno studio accurato e dettagliato del territorio interessato dalla PSA per definire le aree da recintare, al fine di fermare l'avanzamento dell'infezione verso i territori indenni, sull'esempio della precedente gestione di successo da parte del Belgio.

La burocrazia italiana ha purtroppo comportato un rallentamento nella costruzione delle recinzioni e, al termine della costruzione, alcuni casi positivi erano già stati notificati al di fuori dal perimetro recintato. Inoltre il particolare paesaggio delle aree urbane attraversate da torrenti e ponti e circondate da aree rurali e boschive ha reso difficile la completa chiusura dell'intero perimetro, così che un piccolo tratto di recinzione non è mai stato realizzato.

Nonostante le misure messe in atto la PSA ha continuato a diffondersi in queste regioni e sono stati rilevati nuovi casi positivi tra i cinghiali in diversi altri comuni. Il 26 giugno 2023 è stato confermato il primo caso positivo di cinghiale in Lombardia, rendendo l'incursione triregionale.

La PSA ha coinvolto otto grandi allevamenti di suini nella regione Lombardia. Sono state prontamente definite zone di protezione e di sorveglianza e sono stati attuati l'abbattimento e lo smaltimento delle carcasse dei suini per debellare i focolai presenti.

La Lombardia, come altre regioni del Nord Italia, è caratterizzata da un sistema di allevamento

intensivo con una media di oltre 1000 capi per azienda. Sebbene la normativa italiana (Decreto del 28 giugno 2022 sui Requisiti di Biosicurezza per gli allevamenti di suini) richieda un elevato livello di biosicurezza per gli allevamenti suini, la verifica ufficiale degli allevamenti interessati da parte delle Autorità Veterinarie locali durante le ispezioni ha mostrato la presenza di lacune nell'applicazione dello stesso, tra cui la mancanza di procedure di disinfezione agli ingressi delle aziende. È stata richiesta una profonda cooperazione tra le autorità locali, regionali e centrali, i veterinari e gli allevatori per controllare questa allarmante situazione epidemiologica nel Nord Italia.

Da giugno ad agosto sono stati confermati sempre più casi nei cinghiali e il 18 agosto 2023 è stato rilevato il primo focolaio positivo nei suini domestici in provincia di Pavia. Nel giro di poche settimane sono stati coinvolti da una violenta ondata epidemica ben 9 allevamenti.

La prontezza e la tempestività di azione delle Autorità Sanitarie regionali e locali hanno consentito di contenere efficacemente la diffusione dell'infezione evitando il tracollo del settore suinicolo regionale e nazionale da un punto di vista sanitario, economico e commerciale.

Secondo gli ultimi dati epidemiologici nazionali la malattia ha raggiunto anche la regione Emilia Romagna in cui è stato confermato il primo caso il 29 gennaio 2024 in un cinghiale selvatico trovato morto da un cacciatore nel comune di Tornolo e segnalato al Servizio Veterinario della Azienda USL di Parma. (Servizio Sanitario Regionale Emilia Romagna, 2024)

Questa situazione in evoluzione determina la continua rimodulazione delle zone di restrizione.

CENTRO ITALIA: LAZIO

Il Lazio è una regione dell'Italia centrale caratterizzata da un'elevata popolazione di cinghiali (circa 70.000 animali) che vivono nelle aree rurali, periurbane e urbane, e da uno scarso settore della carne suina, caratterizzato dall'allevamento di suini da cortile e da allevamenti commerciali che raggiungono in genere una consistenza di non più di 50 animali.

Il primo caso di PSA è stato rilevato in un cinghiale trovato nella zona nord-ovest della città di Roma il 5 maggio 2022. Analogamente alla gestione epidemia nel Nord Italia, anche in questo caso sono stati necessari una tempestiva notifica alle competenti Autorità comunitarie e internazionali e un attento studio del territorio per individuare le misure più efficaci da mettere in atto per prevenire la diffusione della malattia.

La Regione Lazio ha stabilito il nucleo dell'area infetta all'interno del Grande Raccordo Anulare

che circonda la città di Roma, ma le zone di restrizione comprendevano anche parte del Parco dell'Insugherata, del Parco di Veio, del Parco del Pineto e della Riserva di Monte Mario.

Per confinare l'infezione sono state installate delle recinzioni necessarie a chiudere le zone di attraversamento che potevano essere utilizzate dai cinghiali per poter uscire dall'area infetta, con una conseguente diffusione del virus anche nelle zone indenni più periferiche.

Sono state adottate le seguenti misure: il rafforzamento della sorveglianza passiva sui cinghiali effettuata dal personale di "Roma Natura" e dai Servizi Veterinari, lo smaltimento delle carcasse di cinghiale nel rispetto di rigorose procedure di biosicurezza, l'installazione di segnaletica specifica per delimitare le aree interessate dai casi di PSA, il divieto di dare da mangiare, avvicinarsi e disturbare i cinghiali, nonché il divieto di organizzare eventi e attività all'aperto quali picnic, trekking, raccolta funghi, ecc., oltre alla recinzione delle aree che ospitavano i contenitori per i rifiuti per impedire l'accesso ai cinghiali. Sono state inoltre effettuate: una stima della popolazione di cinghiali locale (circa 2-3 capi/km²), un censimento dei suini presenti negli allevamenti commerciali e familiari con aggiornamento del Database Nazionale, la verifica della presenza di animali liberi detenuti illegalmente, controlli sui suini alloggiati in strutture con scopi non commerciali (suini detenuti come animali domestici).

Nei mesi successivi il numero delle carcasse positive rinvenute localmente è aumentato. Inoltre un caso sospetto di PSA è stato segnalato anche in occasione di un sinistro che ha coinvolto un cinghiale nella provincia di Rieti (a circa 90 km dal ritrovamento di Roma). L'NRL ha confermato la presenza di ASFV e il caso è stato segnalato alla UE. L'attività di sorveglianza condotta per oltre cinque mesi non ha portato al rilevamento di nessuna nuova carcassa positiva al virus e ha consentito di escludere la circolazione virale in questa zona. Il caso sospetto è stato declassato, le zone di restrizione I e II sono state rimosse e lo stato di indennità della provincia di Rieti è stato prontamente ripristinato.

Nonostante le misure adottate nella zona infetta di Roma il 9 giugno 2022 un allevamento di suini all'aperto è risultato positivo alla PSA, non lontano dalla zona in cui era stata trovata la prima carcassa di cinghiale infetta nella regione. A seguito delle disposizioni determinate dal Piano di Emergenza Nazionale sono state intraprese le seguenti azioni: restrizioni alla movimentazione di animali e prodotti di origine animale provenienti dall'allevamento infetto, l'istituzione delle zone di protezione e sorveglianza, lo stamping out all'interno dell'allevamento interessato dal focolaio, un'indagine epidemiologica sulla situazione esistente.

Si è ipotizzato che la mancanza di biosicurezza dell'allevamento inserito in un ambiente suburbano altamente popolato da cinghiali costituisca un importante fattore di rischio per l'introduzione della PSA negli altri allevamenti di suini domestici. Sono stati messi in atto lo smaltimento delle carcasse applicando rigorose procedure di biosicurezza e la pulizia e disinfezione dell'allevamento coinvolto; purtroppo, soprattutto considerando la scarsa qualità e le strutture inadeguate, le operazioni non sono state condotte in modo ottimale. Nelle zone di restrizione II e I i casi positivi di PSA nei cinghiali hanno mostrato un aumento fino a settembre 2022, quando la crescita si è fermata. Da settembre 2022 a maggio 2023 non sono stati rilevati più nuovi casi tra i cinghiali e le autorità hanno ritenuto che l'eradicazione dell'epidemia avesse avuto successo.

Il silenzio epidemiologico che si era registrato da diversi mesi nel comune di Roma aveva dato speranza a tutti gli esperti. Il contenimento assicurato dall'autostrada che circonda la città, le dimensioni ridotte del parco in cui risiedeva la popolazione di cinghiali infetta e il costante monitoraggio effettuato dalle istituzioni locali hanno rappresentato forti premesse per l'eradicazione del cluster di infezione nella zona. Nuovi casi sono stati invece segnalati a maggio e giugno 2023. L'incidenza di casi positivi di PSA nei cinghiali è tornata elevata e si è verificata una nuova fase epidemica. Non è ancora chiara l'origine della nuova ondata di PSA nel Centro Italia, se si tratti di una nuova incursione o di un aumento del tasso di infezione oltre la soglia di rilevamento precedente.

Attualmente desta grande preoccupazione l'individuazione di alcuni casi al di fuori del Grande Raccordo Anulare perché potrebbero rappresentare l'inizio dell'espansione del contagio verso un'area priva di barriere naturali e/o artificiali. Questa situazione ad alto rischio è resa ancora più complessa dall'intervento degli attivisti per i diritti degli animali che si sono opposti alle misure di controllo della PSA adottate. In particolare sono state sabotate le trappole installate per lo spopolamento dei cinghiali nella zona infetta e sono stati "salvati" gli animali malati, sottraendoli al controllo del Servizio Veterinario. Quest'ultima attività è particolarmente rischiosa perché favorisce la diffusione dell'infezione attraverso la movimentazione di animali che potrebbero essere portatori e diffusori del virus della PSA.

SUD ITALIA: CALABRIA

La Calabria è una regione dell'Italia meridionale caratterizzata da una moderata popolazione di cinghiali (circa 60.000 animali) abitanti delle aree rurali e forestali e da un piccolo settore della

carne suina caratterizzato per lo più da allevamenti familiari o selvatici e semibradi, che in genere non raggiungono una consistenza di più di 200 animali.

Nel maggio 2023 tre cinghiali trovati morti nel comune di Cardeto (provincia di Reggio Calabria) sono stati confermati positivi alla PSA dall'NRL. Un altro caso positivo è stato riscontrato nel comune di Bagnara Calabria a 40 km da Cardeto, dove era stato registrato il primo caso nella regione. In questo territorio la popolazione di cinghiali appare moderata, varia da 0-2 capi/km²; tuttavia la presenza di numerosi suini allevati in cortile e di piccoli allevamenti commerciali con bassi livelli di biosicurezza rappresenta un fattore di rischio per l'introduzione della PSA nel territorio. Sono state applicate misure quali il rafforzamento della sorveglianza passiva dei cinghiali e l'implementazione dell'attuazione di misure di biosicurezza nelle zone infette e nelle zone di sorveglianza per evitare la diffusione della malattia nelle zone libere vicine ai casi confermati. Successivamente il contagio si è diffuso a due piccoli allevamenti di suini domestici nel comune di Africo, a 70 km dal focolaio di cinghiali precedentemente individuato. Le mandrie si trovavano in un'area forestale rurale nel Parco Nazionale dell'Aspromonte, area in cui non erano in vigore particolari misure di biosicurezza. Sono state definite zone di protezione e sorveglianza per l'epidemia ed è stato disposto l'abbattimento di circa 80 animali. Per debellare tempestivamente la diffusione del virus sono state messe in atto misure quali: la corretta sepoltura delle carcasse presenti nell'allevamento e intense procedure di pulizia e disinfezione degli ambienti. Nonostante l'applicazione delle nuove misure di biosicurezza più stringenti si sono verificati nuovi casi tra i cinghiali e l'infezione ha continuato a diffondersi in tutte le direzioni in questa regione. La situazione è apparsa subito piuttosto difficile da gestire. L'anagrafe dei suini presenti negli allevamenti della zona interessata è risultata non aggiornata e lo stesso vale per altri allevamenti della regione. Il livello generale di biosicurezza applicato è apparso carente ed è certamente lecito ritenere che molti movimenti di animali possano essere sfuggiti al controllo veterinario. La popolazione di suini selvatici è stata difficilmente controllabile sia perché il territorio è molto accidentato ed esteso, sia perché le autorità regionali hanno faticato ad organizzare una sistematica tracciabilità delle carcasse ai margini dell'area infetta, come indicato nel Piano Nazionale di Emergenza.

In Calabria l'individuazione di casi di PSA nei cinghiali e la successiva epidemia nei suini domestici hanno messo in discussione il sistema di gestione regionale. Nonostante di recente siano stati organizzati diversi corsi di formazione che hanno coinvolto sia veterinari che altri

soggetti interessati, il livello pratico di consapevolezza di fronte ai fatti non è risultato adeguato ad affrontare l'emergenza. Sono state evidenziate carenze nella gestione dei sistemi e dei flussi informativi che sono alla base delle indagini epidemiologiche. Appare chiaro che il trend endemico della PSA in quest'area sia già consolidato e pertanto sarà necessario studiare attentamente l'evoluzione epidemiologica dell'infezione in questo contesto.

Al contrario la reazione del Sistema Veterinario al focolaio individuato nella provincia di Salerno è stata più efficace; l'effettiva area infetta appare al momento piuttosto limitata ma la densità della popolazione di cinghiali e la conformazione del territorio preoccupano gli esperti, che anche in questo caso temono una probabile evoluzione in senso endemico della PSA.

CENTRO-SUD ITALIA: CAMPANIA

La Campania è una regione dell'Italia centro-meridionale caratterizzata da una moderata popolazione di cinghiali (circa 55.000 animali) presenti nelle aree rurali e periurbane e da uno scarso settore delle carni suine caratterizzato per lo più da allevamenti familiari o bradi e semibradi, che in genere non raggiungono più di 20 capi ciascuno; si possono trovare anche allevamenti commerciali sparsi per la regione con una consistenza maggiore di 100 animali.

Il 22 maggio 2023 la PSA è stata confermata in Campania nel comune di Sanza e Montesano sulla Marcellana (provincia di Salerno) in cinque carcasse di cinghiale in avanzato stato di decomposizione. Il Presidente della Regione ha firmato l'ordinanza n. 1 del 26 maggio 2023 che istituisce la zona infetta nei comuni di Buonabitacolo, Casalbuono, Casaletto Spartano, Castelle in Pittari, Montesano sulla Marcellana, Monte San Giacomo, Morigerati, Padula, Piaggine, Rofrano, Sala Consilina, Sassano, Sanza, Teggiano, Torraca, Tortorella e Valle dell'Angelo. Considerando il ritrovamento di altre carcasse di cinghiale positive ad ASFV rinvenute in prossimità del confine con la Basilicata la gestione dell'epidemia nei cinghiali ha richiesto un coinvolgimento biregionale. Una stima della densità dei cinghiali ha mostrato da 1-5 capi/ km².

Per prevenire l'ulteriore diffusione della PSA nel territorio e il coinvolgimento del settore dei suini domestici è stata avviata una campagna coordinata ed efficace per ridurre la popolazione di cinghiali mediante caccia mirata e cattura con eutanasia.

SARDEGNA

In questo contesto di nuove incursioni del virus la storia della PSA in Sardegna occupa un capitolo a parte. La Sardegna è stata colpita per la prima volta da ASFV genotipo I nel 1978, probabilmente a causa dell'introduzione di rifiuti alimentari contaminati nella regione.

Sebbene la densità dei cinghiali, che varia da 0-1 capo/km², sia relativamente bassa rispetto ad altre regioni italiane (Pittiglio et al., 2018) l'infezione è diventata endemica a causa della simultanea presenza di alcune caratteristiche geografiche, socio-culturali e del sistema agricolo tipico della regione.

La Sardegna costituisce un contesto complesso in cui si ha la compresenza di suini domestici, cinghiali, suini allevati in cortile e suini allevati illegalmente allo stato brado sia nelle zone interne che montuose dell'isola, in cui questi animali vivono a stretto contatto con i cinghiali selvatici, creando le condizioni ideali per la diffusione e la persistenza della PSA.

L'allevamento illegale di suini allo stato brado costituisce da diversi decenni una parte fondamentale della radicata tradizione agropastorale sarda. In questo sistema i maiali venivano ingrassati in un piccolo cortile per diversi mesi prima di essere macellati durante le feste familiari, di solito all'inizio dell'inverno, oppure alcune scrofe venivano trattenute per produrre suinetti che venivano a loro volta macellati alla fine dello svezzamento e utilizzati per il tradizionale pasto sardo, diffuso oggi in tutte le regioni italiane (Wilkinson, 1984).

Divenne presto chiaro che la presenza di suini allevati all'aperto, di allevamenti con un livello di biosicurezza carente o insufficiente e, di conseguenza, i movimenti incontrollati di suini all'interno di queste realtà erano le cause più probabili della persistenza della PSA in Sardegna (Cappai et al., 2018; Jurado et al., 2018; Mur et al., 2014). Questi peculiari sistemi di allevamento hanno rappresentato i punti chiave su cui si sono concentrate le misure di eradicazione della PSA, in attesa di un successo.

Nel 2015 è stata promossa una nuova strategia di eradicazione del virus che è stata adattata al contesto locale e poi pienamente attuata entro il 2016. Tale strategia di eradicazione ad hoc è stata pienamente supportata e accettata da tutte le Autorità locali e dalle altre parti interessate. Il piano di eradicazione ha confermato il divieto dell'allevamento di suini allo stato brado (Decreto Regionale n.69 del 18 dicembre 2012, approvato con Delibera 2011/807/UE) e ha imposto norme di biosicurezza stringenti negli allevamenti sardi all'aperto.

Sono stati forniti incentivi agli agricoltori per garantire l'adozione di queste norme di biosicurezza e per abbandonare le pratiche illegali, sono state condotte campagne di sensibilizzazione sulle malattie infettive (Rolesu et al., 2021). Gli incentivi includevano finanziamenti per implementare il livello di biosicurezza dell'allevamento attraverso l'installazione di doppie recinzioni e finanziamenti per il settore della riproduzione.

Le ispezioni ed i controlli veterinari sono stati rafforzati lungo tutta la filiera suinicola in maniera sempre più rigorosa. Sono state applicate regole più severe anche al settore della caccia, comprese quelle riguardanti lo smaltimento sicuro delle frattaglie dei cinghiali abbattuti.

Le misure di controllo sono state accompagnate da una formazione intensiva del personale coinvolto in queste procedure e da attività di sensibilizzazione e comunicazione rivolte agli agricoltori, ai cacciatori e in generale alla popolazione.

Sono stati autorizzati e sovvenzionati gli allevamenti di suini all'aperto con doppia recinzione come alternativa all'allevamento di suini allo stato brado. Nel corso di circa 60 azioni di tipo militare a partire dal novembre 2015 quasi 5.000 suini allevati in libertà hanno dovuto essere abbattuti (Loi et al., 2019).

Queste azioni hanno consentito alla Sardegna di rimuovere gli allevamenti illegali di suini allo stato brado, di ridurre la popolazione di cinghiali e di migliorare il livello di biosicurezza di tutti i tipi di allevamenti, nonché di ridurre il numero di nuovi focolai di PSA nei suini domestici e nei cinghiali selvatici (Rolesu et al., 2021). Tutte le azioni di cui sopra sono state rese possibili dall'implementazione di un'efficace catena di comando a livello regionale che, con il supporto dell'Autorità centrale, ha applicato le nozioni tecniche da tempo suggerite dagli esperti.

Negli anni successivi il numero di focolai notificati sia nelle popolazioni di cinghiali che di suini domestici è diminuito. Nel settembre 2018 il virus è stato rilevato per l'ultima volta nei suini domestici (Mamoiada, provincia di Nuoro), mentre gli ultimi suini allevati all'aperto illegali e gli ultimi cinghiali positivi alla PCR sono stati rilevati rispettivamente nel gennaio 2019 e nell'aprile 2019 (Bultei, provincia di Sassari) (Rolesu et al., 2021).

Recentemente l'EFSA ha proposto una strategia riguardante l'ultima fase di eradicazione della PSA denominata "strategia di uscita", per la quale è fondamentale fornire prove cumulative dell'assenza di circolazione di ASFV nelle popolazioni di cinghiali (Danzetta et al., 2020) per ottenere lo status di indennità dalla malattia. La strategia di uscita è caratterizzata da due fasi: una fase di screening iniziale e una fase di conferma finale. Ogni Paese deve elaborare la

propria strategia di uscita specifica adattata al contesto epidemiologico, al tempo necessario per completare le fasi di screening e di conferma e per stimare il numero di carcasse da trovare per dimostrare lo stato di indennità della regione.

Questo approccio si basa principalmente sulla sorveglianza attiva e passiva dei suini domestici e dei cinghiali mediante l'ausilio di test molecolari e sierologici. Poiché, secondo il Regolamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo e del Consiglio, gli animali sieropositivi sono considerati casi positivi confermati e quindi segnalabili alla UE il successo della strategia di uscita è strettamente dipendente dal mancato riscontro di animali sieropositivi nel territorio investigato. Per aumentare il numero di cinghiali testati e standardizzare il numero di carcasse rinvenute in un'area di 1000 km² è stato sviluppato un sistema di controllo noto come WBC-Counter Tool (Cappai et al., 2022).

I criteri di regionalizzazione previsti dalla normativa UE sono stati applicati in forma molto rigorosa in Sardegna: l'intera regione è stata considerata come zona a più alto livello di rischio per un periodo di tempo prolungato nonostante l'evidenza sul campo e in laboratorio della circolazione attiva di ASFV limitata alla sola provincia di Nuoro. Più recentemente la zona regolamentata è stata ridotta più volte riconoscendo l'evoluzione epidemiologica del suo status. Dal punto di vista epidemiologico il riscontro di un basso numero di animali sieropositivi nell'ambito della sorveglianza attiva non ha alcuna rilevanza. Diversi autori hanno ridimensionato il ruolo degli animali sieropositivi come diffusori del virus sia nei suini domestici che nei cinghiali (Ojševskis et al., 2023; Ståhl et al., 2019). A questo proposito è opportuno precisare che gli animali sieropositivi ancora rinvenuti in Sardegna rappresentano un riflesso della passata circolazione virale attiva nel territorio e non un indicatore di circolazione virale attiva attuale. Sulla base di questi dati è in corso una richiesta italiana alla UE per eliminare la sorveglianza sierologica nell'ultima fase di eradicazione della PSA in Sardegna. Questo passaggio è considerato necessario per accelerare il processo di ottenimento dello status di indennità da PSA. La Sardegna ha sviluppato una strategia di uscita specifica ben funzionante ed è stata osservata una diminuzione degli animali sieropositivi. Tuttavia sono stati ancora rilevati alcuni animali sieropositivi sparsi (sia nei suini domestici che nei cinghiali), quindi lo status di indennità non può ancora essere richiesto alla CE. (Pavone et al., 2023)

LA GESTIONE DEI FOCOLAI IN ITALIA

Numero di animali positivi alla PSA per regione e provincia dal 01/01/2022 al 07/03/2024 06:02 (1670 casi nei cinghiali e 21 focolai nei suini)

Regione	Provincia	Cinghiale (casi)	Suino (focolai)
Calabria	Reggio Calabria	17	6
Campania	Salerno	30	0
Emilia Romagna	Parma	9	0
Emilia Romagna	Piacenza	45	0
Lazio	Roma	91	1
Liguria	Genova	575	0
Liguria	Savona	154	0
Lombardia	Pavia	121	9
Piemonte	Alessandria	613	0
Piemonte	Asti	7	0
Sardegna	Nuoro	3	5
Sardegna	Sassari	4	0
Sardegna	Sud Sardegna	1	0
Totale		1670	21

Tabella 1: l'andamento e la distribuzione del numero dei focolai in Italia, della loro localizzazione e delle specie colpite dal 01/01/2022 al 07/03/2024 ore 06.02. (3tre3, 2024)

Nella tabella è possibile osservare l'andamento e la distribuzione del numero dei focolai in Italia aggiornati nel periodo tra il giorno 1 gennaio 2022 e il 7 marzo 2024, della loro localizzazione e delle specie colpite. (3tre3, 2024)

L'approccio adottato in Italia per controllare ed eradicare la malattia è simile a quello applicato in diversi altri Paesi e segue le linee guida dell'EFSA e della FAO.

Il successo delle azioni dipende da quanto rigorosamente ed efficacemente le misure attuate vengono imposte e rispettate da ciascun Paese. Le esperienze pregresse hanno dimostrato che paesi come il Belgio e la Repubblica Ceca sono stati in grado di affrontare la sfida della PSA e di eradicare la malattia mentre altri paesi (come Italia, Germania, Polonia, Romania, Ungheria, Estonia, Lettonia, Lituania, ecc.) nonostante le misure attuate hanno difficoltà a fermarne l'avanzamento.

I fattori che hanno comportato una tale diffusione della PSA in Italia nonostante le misure messe in atto nel Paese sono di vario tipo, a partire da un'analisi della popolazione di cinghiali selvatici, specie inizialmente colpita, considerata responsabile della diffusione della patologia anche nel comparto dei suini domestici. Come puntualizzato da Pavone et al. il controllo della PSA nei cinghiali richiede una strategia inclusiva che comprenda varie misure e riguardi varie

realtà.

Nelle prime fasi dell'emergenza l'Italia ha risposto in modo efficace e tempestivo attraverso l'adozione di misure approvate dalla CE. Attraverso la guida di esperti internazionali che avevano maturato un'esperienza diretta nei confronti della PSA in altri contesti è stata ideata una strategia onerosa ma fattibile e, soprattutto, che sembrava avere buone possibilità di successo.

Una criticità della strategia adottata è stata il difficoltoso dialogo istituzionale tra Autorità centrali/esperti nazionali e istituzioni regionali, che di conseguenza ha comportato lo scarso coinvolgimento della popolazione locale nell'accettare e nel rispettare le misure restrittive adottate, come il divieto di eventi pubblici e sociali nelle aree soggette a restrizioni. Questo fattore sociale ha certamente complicato la gestione delle misure di controllo della PSA e la loro sostenibilità.

La costruzione di un sistema di recinzione per impedire la diffusione della PSA dalle zone infette alle aree libere, la rapida rimozione delle carcasse di cinghiali contaminate nell'area infetta e la diminuzione della popolazione di cinghiali nell'area cuscinetto che circonda l'area infetta sono state le azioni più importanti attuate. Per quanto riguarda il sistema di recinzione è stato preparato e iniziato con ritardo un progetto modificato e poi ridotto, che ha consentito al virus di diffondere all'esterno delle barriere prima del completamento dell'opera. Ciò ha dimostrato che le procedure amministrative italiane utilizzate per la costruzione del sistema di recinzione hanno costituito un punto critico per il successo della strategia di controllo.

La strategia principale del programma italiano di sorveglianza ed eradicazione della Peste Suina Africana è il rafforzamento della sorveglianza passiva nei cinghiali nelle zone di restrizione I e II. Questa attività si basa sulla ricerca attiva delle carcasse di cinghiale sul territorio italiano e sul loro smaltimento in sicurezza.

Sebbene il tempo di persistenza delle carcasse di cinghiale e la persistenza del virus della PSA nel terreno sottostante alle carcasse infette siano ancora due principali fonti di incertezza nell'epidemiologia della PSA, la localizzazione rapida e la rimozione delle carcasse sono considerate in effetti una delle più importanti misure di controllo della malattia nelle regioni colpite (Carlson et al., 2020; Mazur-Panasiuk et al., 2019; Probst et al., 2019).

Su tutto il territorio italiano è in corso la sorveglianza passiva anche dei suini domestici (test molecolare sulla milza degli animali deceduti; due suini/settimana per regione).

E' stata intensificata l'attività di verifica dei livelli di biosicurezza presenti negli allevamenti da parte dei Veterinari ufficiali ed è stata implementata l'attività di sorveglianza attiva.

L'epidemia di PSA in Italia presenta caratteristiche uniche ed è caratterizzata dalla circolazione del virus nel contesto di una macchia mediterranea con un'elevata densità di cinghiali e una conformazione geografica molto peculiare. In quest'ottica l'unica esperienza simile nel controllo della PSA è rappresentata dalla Sardegna con il genotipo I. Tuttavia in Sardegna i fattori di rischio primari erano rappresentati da un elevato numero di suini allevati all'aperto e da movimenti incontrollati dei suini stessi. Sebbene questi elementi non siano presenti nel Nord Italia (Piemonte, Liguria e Lombardia) il fattore umano rappresenta uno dei fattori di rischio più significativi in quest'area. Infatti le attività umane come la raccolta del legno e di altri prodotti forestali, il turismo all'aria aperta, la caccia, ecc., creano le basi per una diffusione facile ed incontrollabile della malattia, sebbene non sia disponibile alcuna evidenza sul legame tra i focolai di infezione in Nord, Centro e Sud Italia.

Come è noto, la PSA può diffondersi facilmente attraverso il contatto ravvicinato tra cinghiali infetti e animali sani soprattutto quando la pressione dei cinghiali positivi nella zona infetta e la popolazione di cinghiali nella zona indenne da PSA sono entrambe elevate. Questo è ciò che accade nelle zone infette italiane come Piemonte-Liguria-Lombardia, regioni in cui la persistenza endemica locale della PSA implica una diffusione geografica costante.

Tuttavia la PSA è in grado di saltare e coprire anche lunghe distanze. Anche le attività umane legate al commercio illegale di animali o di prodotti a base di carne di maiale svolgono un ruolo chiave nel coinvolgere territori lontani dalle zone infette.

In Italia i casi di PSA riscontrati a lunga distanza si sono verificati quando il virus si è diffuso dal Nord Italia al Lazio (circa 500 km) e poi alla Calabria (circa 800 km).

Le indagini epidemiologiche condotte sull'epidemia nei cinghiali non sono state utili per individuare l'esatta fonte dell'infezione ed è stato possibile solo avanzare ipotesi. Come dimostrato dalle precedenti epidemie di PSA a livello globale quando la malattia viene rilevata nei cinghiali prima o poi viene segnalata anche nei suini domestici, come è avvenuto in Italia.

È evidente anche la presenza di un problema di comunicazione tra realtà locali/regionali/nazionali ma sicuramente molti conflitti di interesse hanno influito negativamente nella gestione della malattia. Il ruolo preponderante che è stato attribuito alla

sovrapopolazione dei cinghiali selvatici e ai danni che questa avrebbe provocato soprattutto all'agricoltura ha creato nel Paese un effetto mediatico che spesso si è sovrapposto all'emergenza della PSA, oscurandola.

Si è pensato che fosse possibile risolvere i due problemi contemporaneamente o approfittare dell'uno per affrontare l'altro, ma spesso si è creata solo confusione. Infatti per eradicare la PSA nei cinghiali è necessario predisporre piani di intervento (eradicazione) specifici e legati al territorio in cui è presente l'infezione. Nei territori esenti da PSA la riduzione della densità dei cinghiali aiuta in termini di prevenzione ma rimane anche un grande vantaggio per gli allevatori. La tendenza all'endemia nei cluster italiani e la progressiva espansione dell'area infetta nel Nord-Ovest del Paese pone il problema di come difendere le aree produttive italiane.

La biosicurezza resta il perno centrale su cui lavorare soprattutto per quanto riguarda gli allevamenti intensivi, non solo in termini di strutture, ma anche di mentalità degli operatori. Inoltre per offrire adeguate garanzie soprattutto per l'export, è necessario un controllo rigoroso dell'intera filiera. Tuttavia in Italia in molti distretti l'allevamento suino è basato su realtà da cortile estensive e bisognerà quindi trovare rapidamente un sistema sostenibile per questo tipo di filiera. (Pavone et al., 2023)

CAPITOLO V: PROSPETTIVE PER IL CONTENIMENTO DELLA LA PSA

VACCINAZIONE

Attualmente non esiste un vaccino contro la PSA commercialmente disponibile in Italia o nell'Unione Europea.

Gli sforzi per sviluppare un vaccino efficace e sicuro in grado di proteggere nei confronti di ASFV hanno avuto inizio già a metà degli anni '60.

Sono stati impiegati diversi approcci: vaccini inattivati, vaccini a subunità, vaccini a DNA, vaccini a vettore e vaccini vivi attenuati (LAV).

Secondo i dati disponibili i LAV con delezione genetica sembrano essere i potenziali candidati a vaccini ideali. Attualmente un LAV con delezione genetica (ASFV-G- Δ I177L) sviluppato in Vietnam è l'unico vaccino in commercio contro la PSA. (Tran, Le, et al., 2022)

Lo sviluppo di vaccini vivi attenuati è caratterizzato da costi elevati, cicli produttivi lunghi e una certa instabilità, fattori che limitano la loro produzione.

I ricercatori si stanno concentrando su vaccini geneticamente modificati come i vaccini a subunità, vaccini a DNA e vaccini a vettore virale, che sono approcci su misura con effetti avversi minimi e profili di sicurezza migliori. (H. Zhang et al., 2023)

Lv et al. nel 2022 ha riconosciuto il ruolo essenziale dei vettori nella trasmissione di ASFV e ha ipotizzato che l'allestimento di un vaccino che protegga dalle zecche possa essere un'alternativa nella prevenzione del contagio nelle aree in cui questo ciclo di trasmissione è presente, in assenza di un vaccino efficace. Studi recenti hanno preso in esame gli effetti immunogeni di alcuni componenti delle zecche iniziando a mixare proteine provenienti dalle uova, estratte dalle ghiandole salivari o dal medio intestino. Sebbene ci siano varie candidate tra le proteine importanti per il ciclo vitale delle zecche non è stato ancora ritrovato l'antigene ideale per l'allestimento del vaccino. Il lancio del vaccino candidato ASFV-G- Δ I177L il 3 giugno del 2022 ha rallentato il processo di ricerca sulle altre alternative. (Lv et al., 2022)

Oggi il principale ostacolo allo sviluppo di un vaccino efficace è dato dalle lacune nella conoscenza della biologia del virus e della risposta immunitaria indotta dall'infezione da ASFV.

Sarebbe importante investigare in maniera più approfondita anche il ruolo dei vari ospiti, dei vettori, dei fattori ambientali che intervengono nella trasmissione del virus, solo così si

potrebbe inquadrare meglio l'epidemiologia della malattia e ottenere migliori risultati. (Chandana et al., 2024)

CONSIDERAZIONI GENERALI E LIMITI

Il controllo biologico del virus è attualmente il metodo più diretto ed efficiente per prevenire la diffusione della PSA, metodo superiore all'impiego di un vaccino (H. Zhang et al., 2023).

Sono fondamentali studi avanzati sul potenziale contributo dei vettori meccanici come l'attività umana, gli artropodi, gli uccelli e i carnivori, alla trasmissione della PSA (Wu et al., 2020). Inoltre potrebbe essere utile indagare il coinvolgimento dei fattori ambientali nello sviluppo della malattia.

I vaccini veterinari sono riconosciuti come un modo economicamente vantaggioso per controllare di norma le malattie infettive, migliorare l'efficienza della produzione alimentare e prevenire o ridurre la trasmissione di infezioni zoonotiche e di origine alimentare.

Gli sforzi per progettare un vaccino efficace contro la PSA sono stati ostacolati da diversi fattori, analizzati nel dettaglio da Urbano et al. (Urbano & Ferreira, 2022)

La diversità dei ceppi di ASFV è una difficoltà importante da considerare nello sviluppo di un vaccino contro la PSA. La protezione crociata è un fenomeno multifattoriale che dipende da numerose variabili.

La maggior parte dei vaccini sperimentali hanno come target i genotipi circolanti in Europa e in Asia e prestano poca attenzione ai 24 genotipi endemici in Africa, è improbabile che si realizzi una protezione crociata contro questi ceppi filogeneticamente più distanti.

La variabilità genetica tra le diverse razze di suini è un altro fattore in gioco, riflesso nei diversi modelli di patogenesi e negli esiti clinici differenti osservati nelle regioni del mondo.

L'alto livello di mutazioni genetiche insieme alla caratterizzazione delle varianti ricombinanti del virus tra gli isolati italiani e sudafricani e l'identificazione delle regioni variabili del MGF e di altre regioni chiave nella ricombinazione si aggiungono a un numero crescente di prove che testimoniano l'elevata plasticità del genoma di ASFV; il rilevamento di varianti del genotipo II che presentano molteplici mutazioni naturali o delezioni in recenti epidemie in Cina, Repubblica Dominicana e Africa occidentale fornisce un'ulteriore prova di questa instabilità del genoma (Faburay, 2022).

Burmakina et al. ha dimostrato che le proteine specifiche per definire il sierotipo di ASFV, CD2v (EP402R) e/o C-type lectin (EP153R) sono importanti per la protezione contro l'infezione da ASFV di ceppo omologo (Burmakina et al., 2019) ma le complessità delle interazioni sinergiche tra più geni sono ancora scarsamente comprese (L. K. Dixon et al., 2019; Rowlands et al., 2009; Sánchez-Vizcaíno et al., 2015; Simões et al., 2019).

I LAV della PSA in fase di sviluppo si basano tutti su modifiche del genotipo II del virus della PSA e, in misura minore, dei ceppi del genotipo I; è emersa una ragionevole preoccupazione sul loro utilizzo in regioni non endemiche a causa del potenziale ritorno alla virulenza da parte di ASFV.

Esiste il rischio significativo che a causa del pesante impatto socioeconomico della PSA le parti interessate siano tentate di utilizzare candidati vaccini apparentemente promettenti prima che la loro efficacia sia stata valutata approfonditamente. Ciò potrebbe in effetti già accadere. Negli ultimi anni varie segnalazioni di circolazione di ceppi del genotipo II e del genotipo I molto simili ai ceppi europei naturalmente attenuati hanno sollevato preoccupazioni sulla circolazione di vaccini senza licenza, poiché identificati in casi di forme croniche di PSA in aziende agricole cinesi. Sebbene il numero di infezioni conosciute sia basso se questi ceppi a bassa virulenza e difficili da diagnosticare dovessero diffondersi ampiamente potrebbero avere gravi conseguenze. Non ultimo il rischio di eventi di ricombinazione tra ceppi vaccinali senza licenza e/o con futuri vaccini autorizzati che aumenterebbe le preoccupazioni sulla sicurezza del vaccino e sul ritorno alla virulenza del virus.

Un altro problema di sicurezza è il rischio di diffusione del virus vaccinale che potrebbe verificarsi in condizioni di campo comportando che un'alta percentuale di suini naive possa venire gravemente infettata dall'esposizione a grandi quantità di un vaccino vivo attenuato. Questa eventualità è stata dimostrata in uno studio di Lacasta et al. (Lacasta et al., 2015)

Le linee guida indicano che la valutazione della sicurezza dei LAV dovrebbe includere lunghi studi che coinvolgono molti animali per valutare il grado e la stabilità dell'attenuazione e che dovrebbero essere implementati i test che distinguono i ceppi attenuati da quelli completamente virulenti e parzialmente virulenti per valutarne la possibile reversione.

Il processo di produzione del vaccino dovrebbe inoltre essere concepito in modo tale da valutare la stabilità dell'attenuazione e per i vaccini basati su organismi geneticamente modificati dovrebbe essere inclusa anche una valutazione del rischio ambientale, compresa la

possibilità di eliminazione degli organismi vaccinali dopo la somministrazione. I risultati degli esperimenti con modelli animali diversi dal suino non sempre sono corrispondenti alla realtà dell'infezione (Argilaguet et al., 2011, 2012) ma gli esperimenti con i suini richiedono l'utilizzo di laboratori di biocontenimento di livello 3 (BSL3) rigorosi, oltre ad essere estremamente costosi e preoccupanti dal punto di vista ambientale ed etico. (Arias, de la Torre, et al., 2017).

Le formulazioni LAV dovrebbero anche essere compatibili con le campagne di immunizzazione della fauna selvatica. I cinghiali sono altamente suscettibili alla PSA e sono stati la principale fonte di diffusione della malattia nell'attuale epizoozia in Europa.

In Cina sono stati segnalati focolai anche nei cinghiali ma non sembra esserci alcun collegamento diretto con l'infezione circolante tra i suini domestici poiché il ceppo causale è diverso dai ceppi precedentemente segnalati (L. Li et al., 2019). Tuttavia, data la numerosa popolazione di cinghiali stimata essere di milioni di capi e la sua ampia distribuzione, esiste un alto rischio di endemicità, che complicherebbe gravemente gli sforzi di controllo ed eradicazione.

Un vaccino specifico per i cinghiali rappresenta quindi un investimento necessario. Sfortunatamente la maggior parte dei LAV sperimentali sono stati somministrati tramite via iniettiva intramuscolare e sono stati condotti pochi studi sull'immunizzazione orale.

Ad oggi è stato dimostrato che solo il ceppo naturalmente attenuato Lv17/WB/Rie1 (Barasona et al., 2019, 2021) protegge efficacemente i cinghiali dall'attacco virulento. Tuttavia per lo studio è stato testato solo un piccolo numero di animali e l'evidenza di diffusione del virus vaccinale da parte di animali vaccinati per via orale potrebbe suggerire che i cinghiali potrebbero essere portatori persistenti del virus.

Un vaccino destinato alla popolazione di cinghiali deve essere somministrato per via orale, è necessario un veicolo di somministrazione adeguato sotto forma di esca che sia anche sufficientemente stabile nell'ambiente per mantenere la sua potenza se esposto a fattori ambientali estremi (Arias, De la Torre, et al., 2017). Dopo gli esperimenti di laboratorio e prima di tentare la vaccinazione delle popolazioni naturali si dovrebbero eseguire prove controllate sul campo che emulino le condizioni di libertà.

La disponibilità di una linea cellulare di macrofagi suini consolidata e autorizzata e l'ottimizzazione delle condizioni di coltura per l'espansione del vaccino rappresentano un altro vincolo chiave per lo sviluppo del vaccino contro la PSA. Con poche eccezioni (Borca, Rai, et al.,

2021; Monteagudo et al., 2017) i candidati vaccini LAV riportati si basano su sistemi di coltura primaria di macrofagi e monociti suini e la produzione di vaccini su larga scala utilizzando cellule primarie di animali non è né eticamente accettabile né fattibile dal punto di vista della produzione.

Le cellule primarie sono laboriose e costose da ottenere e si verificano variazioni significative da lotto a lotto (Arias, de la Torre, et al., 2017). Inoltre vi sono prove di ricombinazione genetica tra ceppi vaccinali attenuati cresciuti insieme nei macrofagi alveolari suini (PAM) (Murtaugh, n.d.) il che comporta il rischio che tali eventi si verifichino anche in vivo se o quando diversi vaccini PAM contro la PSA dovessero iniziare a circolare.

Sebbene siano stati fatti tentativi per adattare alcuni isolati di ASFV a linee cellulari stabili di primati, come VERO e CV-1, questo processo ha generalmente comportato cambiamenti genomici e fenotipici nel virus talvolta annullando la protezione garantita (Krug et al., 2015). Altri ricercatori hanno tentato di caratterizzare le linee cellulari suine per la suscettibilità all'infezione da PSA e la capacità di produzione del virus ma una produzione efficiente sembra dipendere dal ceppo. Da notare è la linea cellulare di macrofagi suini ZMAC-4 dipendente dal fattore di crescita sviluppata da Portugal et al. (Portugal et al., 2020) che è suscettibile all'infezione con otto diversi isolati di campo di genotipo I, II e VIII e supporta elevati livelli di replicazione di OURT88/3 senza ridurre la sua capacità protettiva.

La produzione di un virus vaccinale richiede anche un elevato biocontenimento per la produzione del virus attenuato, garantendo che i vaccini siano prodotti secondo standard di alta qualità e seguendo la politica delle corrispondenti agenzie di regolamentazione.

Numerosi studi riassumono le procedure utilizzate in laboratorio per garantire la sicurezza della vaccinazione e valutare la fattibilità dell'utilizzo di animali negli esperimenti (L. K. Dixon et al., 2020; Sánchez et al., 2019; Sang et al., 2020; Wu et al., 2022).

Anche se tutte queste sfide venissero superate un vaccino contro la PSA rappresenterebbe solo uno strumento per controllare la malattia. La segnalazione di focolai di PSA in regioni indenni comporta restrizioni commerciali ed è necessaria la conferma dell'assenza di malattia per ottenere il permesso di esportazione, un fattore critico nella decisione di vaccinare sarebbe lo stato della malattia nella regione, evidenziando la necessità del ricorso ad una strategia DIVA. Per poter avviare delle campagne di vaccinazione contro la PSA è opportuno sviluppare dei

metodi efficaci per distinguere tra animali infetti e vaccinati utilizzando per l'appunto la strategia DIVA (distinction between infected and vaccinated animals).

Uno dei metodi utilizzabili è un metodo di qPCR, impiegabile per supportare le campagne di vaccinazione associate ai vaccini vivi attenuati in coltura cellulare ASFV- Δ MGF, ASFV-G- Δ 9GL/ Δ UK e ASFV- Δ I177L o ASFV- Δ I177L Δ LVR (Velazquez-Salinas et al., 2021) e l'altro è un test ELISA doppio indiretto basato su p54 e CD2v (Y. Wang et al., 2022)

Sono state inoltre esaminate le prove preliminari che riguardano l'esistenza di un ceppo vaccinale attenuato sicuro ed efficace con sette delezioni genetiche e che fornisce protezione per Lv17/WB/Rie1, ugualmente efficace contro l'infezione da un isolato virulento del virus della PSA (Barasona et al., 2019).

PROGRESSI NELLA RICERCA DEI VACCINI

VACCINI INATTIVATI

I vaccini inattivati contro la PSA sono stati sviluppati per la prima volta negli anni '60.

L'inattivazione virale è ottenuta attraverso metodi fisici e chimici come riscaldamento, utilizzo di toluene, formaldeide e viola cristallino, step a cui fa seguito la valutazione dell'efficacia del vaccino e infine l'aggiunta di un adiuvante (Blome, Gabriel, et al., 2014; Gómez-Puertas et al., 1997).

L'inattivazione del virus è un approccio consolidato per la produzione di vaccini e relativamente semplice da ottenere, con un profilo di sicurezza più elevato rispetto ai vaccini vivi.

Il processo impedisce la reversione del virus ad un fenotipo virulento e i virus vaccinali non sono trasmissibili, sono questi i due svantaggi rilevabili invece nei vaccini attenuati.

L'inattivazione però non si traduce necessariamente nella capacità di un vaccino di scatenare un'immunità protettiva. (Urbano & Ferreira, 2022)

Sono stati effettuati più tentativi di immunizzazione di suini con una grande varietà di antigeni virali inattivati utilizzando metodiche tradizionali ma sebbene a volte si siano dimostrati capaci di scatenare una risposta immunitaria sierologica, non hanno infine garantito una protezione sufficiente (Blome, Gabriel, et al., 2014; Cadenas-Fernández et al., 2021).

Questo risultato non sorprende, dato che la risposta immunitaria cellulare sembra essere essenziale per la protezione dal virus e che è difficile raggiungere una neutralizzazione efficace del virus durante le infezioni primarie (Arias, de la Torre, et al., 2017).

Walczak et al. hanno indicato che gli anticorpi anti-ASFV da soli non sono in grado di inibire la

replicazione del virus, analizzando la possibilità di neutralizzazione dell'ASFV su sieri raccolti da animali sopravvissuti all'infezione (Walczak et al., 2022).

I ricercatori hanno indicato che non è pratico utilizzare il virus della PSA inattivato come vaccino (Blome, Gabriel, et al., 2014; Rock, 2021) ciò potrebbe essere attribuito agli anticorpi non neutralizzanti specifici del virus della PSA (Cadenas-Fernández et al., 2021).

Le inattivazioni multiple nei vaccini inattivati non inducono un'immunità cellulare efficace, ma con la crescente comprensione di ASFV si prevede che il tasso protettivo dei vaccini ASFV inattivati migliorerà con l'aggiunta di adiuvanti affidabili (Sang et al., 2020).

I dati attualmente disponibili suggeriscono nuove opportunità nello sviluppo di un vaccino ASFV inattivato efficace utilizzando i metodi esistenti. (H. Zhang et al., 2023)

VACCINI VIVI ATTENUATI

Come riportato da Urbano et al. i LAV aggirano un problema chiave presentato sia dai vaccini inattivati che dai vaccini a subunità o a DNA. Questi virus possono replicare con successo all'interno dell'ospite, imitano l'infezione naturale e innescano una risposta immunitaria sia umorale che cellulare, oltre a non richiedere l'impiego di adiuvanti con attività costimolatoria per migliorare l'entità e la qualità della risposta immunitaria. È stato dimostrato che alcuni LAV siano in grado di stimolare la produzione di anticorpi IgA mucosali, una caratteristica importante per i vaccini somministrati per via orale (l'immunizzazione orale è un requisito per i vaccini destinati alla popolazione di cinghiali selvatici). (Urbano & Ferreira, 2022)

I LAV presentano un leggero rischio poiché in rari casi i ceppi attenuati possono riacquistare virulenza, causando la diffusione della malattia e hanno il potenziale di causare reazioni avverse post-vaccinazione ed effetti collaterali.

Sono state impiegate tre strategie nella costruzione dei LAVs per ASFV: attenuazione mediante passaggio cellulare, screening di ricerca per ceppi naturalmente attenuati e delezione di geni associati alla virulenza. Per superare alcuni dei problemi di sicurezza presentati dai LAV (soprattutto la virulenza residua) sono stati fatti anche tentativi di ulteriore delezione di geni associati alla virulenza in ceppi naturalmente attenuati o di adattamento a linee cellulari eterologhe di virus con delezione genetica. A seconda dell'immunogenicità dei geni deleti

questi candidati vaccini potrebbero essere idonei anche per accompagnare l'impiego di strategie DIVA.

LAVs basati su isolati virali naturalmente attenuati

Il vaccino contiene un patogeno trattato altamente vitale e fortemente immunogenico che può aumentare la sua virulenza. Alcuni ceppi di ASFV naturalmente a virulenza ridotta possono essere utilizzati per lo sviluppo di questi vaccini (W. Chen et al., 2020) assieme a ceppi naturalmente attenuati non emoadsorbenti (non-HAD). (Urbano & Ferreira, 2022)

Alcuni di essi sono stati isolati da zecche molli o suini colpiti da una forma cronica da ASFV genotipo I, come i ceppi OURT88/3, NH/P68 oppure Lv17/WB/Rie1, isolato dai cinghiali selvatici in Lettonia (Arias, de la Torre, et al., 2017; Boinas et al., 2004; Gil et al., 2008).

I vaccini vivi attenuati preparati da OURT88/3 si sono dimostrati protettivi nei suini nei confronti di ceppi più virulenti omologhi (con livelli di protezione compresi tra il 66 e il 100%) ma il livello di protezione non era sempre soddisfacente a causa delle differenze individuali tra i suini, della dose di vaccino, dei ceppi da attaccare (W. Chen et al., 2020).

Gallardo et al ha isolato con successo un ceppo non-HAD di ASFV appartenente al genotipo II, Lv17/WB/Rie1, da un cinghiale in Lettonia. I suini che sono sopravvissuti al vaccino con questo ceppo sono stati infettati due mesi dopo con un ceppo fortemente emoadsorbente e hanno mostrato segni clinici non specifici o subclinici (C. Gallardo, Soler, et al., 2019).

Questo studio riporta un modello di reinfezione di ASFV che presenta protezione crociata verso i ceppi non HAD, suggerendone la persistenza a lungo termine negli allevamenti di cinghiali.

Il fatto che gli animali immunizzati con ceppi naturalmente attenuati mostrino effetti collaterali significativi come febbre, danni alla pelle e gonfiore articolare, ostacola lo sviluppo di questi ceppi in un vaccino ASFV (Leitão et al., 2001b; Mulumba-Mfumu et al., 2016).

Esiste preoccupazione sulla loro virulenza residua poiché una parte sostanziale dei suini vaccinati, almeno a determinate dosi, sviluppa reazioni post-vaccinazioni non accettabili. (Urbano & Ferreira, 2022) Questi vaccini presentano inoltre numerosi effetti collaterali oltre al rischio di nuova trasmissione del virus, che ne limita l'uso in ambito clinico (Chen et al., 2020).

Al momento per determinare se l'utilizzo del ceppo Lv17/WB/Rie1 naturalmente attenuato come prototipo di vaccino per il controllo della trasmissione del virus tra cinghiali sia efficace servirebbero ulteriori ricerche (Barasona et al., 2021).

L'effetto immunoprotettivo dei diversi ceppi attenuati varia in base al tipo di virus così come varia in base alla dose di vaccino (bassa e moderata, 10³ o 10⁴ TCID₅₀) e alla via di somministrazione (intranasale o IM) (Sánchez-Cordón et al., 2017).

Il ceppo naturalmente attenuato NH/P68 (genotipo I) ha dimostrato una protezione del 100% verso il ceppo virulento L60 (genotipo I) ma è risultato meno protettivo nei confronti del ceppo eterologo Arm/07 (genotipo II) (C. Gallardo, Soler, et al., 2019).

La vaccinazione iniziale con OURT88/3 seguita da un'immunizzazione di richiamo con il ceppo OURT88/1 ha prodotto una protezione immunitaria dell'85%.

L'esposizione ai ceppi Benin 97/1 e Uganda 1965 ha dimostrato una protezione del 7% e del 100% rispettivamente. Questi dati fanno presagire che l'immunizzazione contro ceppi naturalmente attenuati possa superare la sfida della protezione verso ceppi non omologhi (K. King et al., 2011).

La protezione immunitaria fornita dai LAV naturali deve essere ancora chiarita ma questa tipologia di vaccini ha raggiunto notevoli progressi in tutto il mondo (Liu et al., 2021).

La differenza con i vaccini attenuati artificialmente è data dall'eliminazione in questi ultimi di alcuni geni responsabili della virulenza (O'Donnell et al., 2017; J. Zhang et al., 2021).

In generale i LAV forniscono una totale protezione omologa e una parziale protezione eterologa (Teklue et al., 2020) e sono strumenti ideali per analizzare i meccanismi coinvolti nella cross protezione (Lacasta et al., 2015; Lopez et al., 2020) tuttavia i problemi legati a virulenza, immunogenicità, fenotipo virale e diversità antigenica continuano a influenzare la scelta di questi vaccini rispetto ad altri.

LAVs ottenuti con passaggi successivi in colture cellulari

I vaccini ottenuti con passaggi nelle colture cellulari sono dei vaccini vivi attenuati che comportano la delezione di parte del genoma virale, riducendo la virulenza del virus.

Negli anni '60 uno studio di laboratorio ha dimostrato che un vaccino contro ASFV attenuato,

indebolito dalla trasmissione dalle cellule di midollo osseo suino, aveva un effetto protettivo verso l'attacco da parte di un ceppo più virulento.

Secondo lo studio di Krug et al. il ceppo virulento ASF-G è stato completamente attenuato dopo 110 passaggi successivi nelle cellule Vero ma i suini immunizzati verso il ceppo attenuato non sono risultati protetti contro di esso (Krug et al., 2015).

I passaggi in colture cellulari possono essere effettuati su linee cellulari come la 293 e le cellule Vero ma la virulenza e l'antigenicità dei ceppi adattati appaiono diminuite e i ceppi così attenuati non forniscono una protezione efficace dopo l'immunizzazione dei suini (Krug et al., 2015; T. Wang, Wang, et al., 2021).

I LAV ottenuti in vitro sono basati generalmente su cellule primarie costituite principalmente da macrofagi alveolari suini (PAMs) e cellule PBM ma le cellule primarie non sono in grado di garantire una produzione di LAV in larga scala.

Dato il fallimento di tanti LAV che sono stati sperimentati sono ancora necessari ulteriori studi per poterne migliorare l'efficacia. Nel 2021 Borca et al. hanno riportato che ASFV-G- Δ I177L/ Δ LVR, che mantiene lo stesso livello di attenuazione, lo stesso profilo di immunogenicità ed efficacia protettiva di ASFV-G- Δ I177L, è stato replicato in modo efficiente in linee cellulari stabili suine, ciò potrebbe comportare il superamento dei limiti imposti dall'utilizzo di soli macrofagi alveolari suini primari (Borca, Rai, et al., 2021; Borca, Ramirez-Medina, et al., 2021).

Nel 2021 e 2022 sono state scoperte rispettivamente la proteina F317L, con la funzione di inibire la risposta immunitaria innata dell'ospite, e le proteine EP364R e C129R che inibiscono la segnalazione dell'interferone I, fornendo nuove informazioni per comprendere come ASFV inibisce la risposta immunitaria innata dell'ospite e fornendo nuovi strumenti per lo sviluppo di un vaccino vivo attenuato contro la PSA (Dodantenna et al., 2022; J. Yang et al., 2021).

Borca et al. hanno affermato che il sistema di editing del genoma CRISPR/Cas9 può modificare le sequenze bersaglio nel genoma con alta precisione e migliorare l'efficienza del processo di purificazione di ASFV fornendo nuovi metodi per lo sviluppo di LAV ricombinanti verso ASFV (Borca et al., 2018). Sebbene ci siano molti progressi rimangono ancora tanti aspetti da indagare in futuro per lo studio dei vaccini LAV. (H. Zhang et al., 2023)

LAVs ottenuti con delezione di geni specifici

La terza strategia, fondamentale per l'attuale ricerca di LAVs, prevede la rational deletion di geni associati alla virulenza o coinvolti nei processi di evasione della risposta immunitaria, attuata mediata ricombinazione omologa o editing genomico CRISP/Cas9.

Questo approccio è in fase di sviluppo per arrivare ad un miglioramento del profilo di sicurezza dei ceppi naturalmente attenuati e per l'attenuazione di ceppi virulenti circolanti. (Urbano & Ferreira, 2022)

Finora sono stati presi di mira diversi geni: l'emoagglutinina CD2v/EP402R, la timidina chinasi TK/K169R, l'inibitore di NF- κ B e NFAT A238L, gli inibitori dell'apoptosi A179L e A224L, l'attivatore della proteina fosfatasi-1 NL/DP71L, i geni coinvolti nell'inibire l'induzione degli interferoni di tipo I come MGF 360 e 505 e i non omologhi I329L, K205R, DP148R e A276R, e di geni implicati nella virulenza di diversi ceppi virulenti del virus della PSA ma il cui meccanismo d'azione non è chiaro, incluso 9GL/B119L, UK/DP96R, I177L, I226R, A137R ed E184L (Arias, De la Torre, et al., 2017; Sang et al., 2020; T. Wang, Luo, et al., 2021).

La rational deletion non sempre produce il risultato desiderato. (Urbano & Ferreira, 2022)

LAVs a delezione di un singolo gene

Attualmente gli approcci alla progettazione del vaccino contro la PSA si concentrano sullo sviluppo di vaccini vivi modificati attraverso una delezione genetica mirata applicata su diversi isolati (Turlewicz-Podbielska et al., 2021)

Nella review di Zhang et al. (H. Zhang et al., 2023) sono raggruppati alcuni dei tentativi di costruzione di vaccini con delezione di un singolo gene che hanno dimostrato risultati promettenti. I geni la cui delezione è stata indagata sono:

- Gene Benin 97/1/DP148R (Reis et al., 2017).
- NH/P68/A238L, A224L, A276R, EP153R (C. et al., 2018)
- Gene SY18/L7L-L11L (J. Zhang et al., 2021).
- Geni Malawi Lil-20/1, Georgia 2007, Pretoriuskop/96/4 (Pret4)/9GL (Carlson et al., 2016; Lewis et al., 2000; O'Donnell et al., 2015)
- Gene Georgia 2010/E184L (Ramirez-Medina et al., 2022) - E184L è il primo prodotto genetico sperimentale per la PSA a funzionare come marker antigenico DIVA.

- Gene BA71/CD2v(Bosch-Camós et al., 2022; Monteagudo et al., 2017)
- Gene Georgia/TK(Sanford et al., 2016)
- OURT88/3I329L(Reis et al., 2020)
- Benin 97/1/MGF (Sánchez-Cordón et al., 2020)

Gene ASFV-G/I177L

Come riportato da Tran et al. il Dipartimento dell'Agricoltura degli Stati Uniti ha recentemente sviluppato un candidato vaccino sperimentale ricombinante, ASFV-G- Δ I177L, cancellando il gene I177L dal genoma del ceppo pandemico altamente virulento Georgia ASFV, che protegge efficacemente i suini dal virus parentale. In questo caso gli studi iniziali sono stati estesi dimostrando che l'ASFV-G- Δ I177L è in grado di proteggere i suini dall'isolato virulento dell'ASFV attualmente circolante e patogeno in Vietnam con un'efficacia simile a quella riportata contro il ceppo della Georgia. Studi comparativi eseguiti su un elevato numero di suini di origine europea e vietnamita hanno dimostrato che una dose protettiva minima di 10² HAD₅₀ di ASFV-G- Δ I177L protegge equamente gli animali di entrambe le provenienze.

In concomitanza con questi risultati lo sviluppo di immunità in queste razze animali ha dimostrato la comparsa di protezione in circa un terzo dei soggetti testati entro la seconda settimana dalla vaccinazione, con una protezione completa raggiunta entro la quarta settimana. I risultati hanno dimostrato che ASFV-G- Δ I177L è in grado di indurre protezione contro i ceppi virulenti di campo di ASFV vietnamita e che il vaccino è efficace nel proteggere le razze locali di suini con la stessa efficienza precedentemente dimostrata per i suini incrociati europei.

A nostra conoscenza quello di Tran et al. è il primo rapporto che mostra l'efficacia di un candidato vaccino basato sull'isolato Georgia 2007 in razze di suini asiatiche o infettate da un ceppo asiatico di PSA.

Lo studio di Tran et al. ha valutato la sicurezza di questo vaccino in suini di età compresa tra 6 e settimane che non hanno mostrato sintomi generali di PSA ma solo segni clinici sporadici e transitori come tosse lieve e feci molli (Tran, Phuong, et al., 2022).

Il test di riduzione della virulenza ha dimostrato la stabilità del vaccino attenuato restituendo vivi cinque gruppi consecutivi di suini. Pertanto ASFV-G- Δ I177L è un candidato vaccino sicuro e realizzabile, ma non ancora in commercio nel nostro territorio.

LAVs a delezione di geni multipli

La sicurezza è un requisito chiave per lo sviluppo di vaccini attenuati. I ricercatori seguono una tendenza nello sviluppo di LAV con delezioni geniche multiple proprio per aumentarne la sicurezza (Borca et al., 2020; Borca, Rai, et al., 2021; Borca, Ramirez-Medina, et al., 2021).

Sebbene lo sviluppo di vaccini attenuati non abbia avuto fino ad ora molto successo, l'Istituto di ricerca veterinaria di Harbin in Cina ha sviluppato un ceppo vaccinale attenuato con la delezione di sette geni che ha superato gli studi di laboratorio con una dimostrazione iniziale di sicurezza ed efficacia (W. Chen et al., 2020)

Nel complesso la strada che porterà i LAVs ad essere commercializzati è ancora lunga a causa di motivi di sicurezza. Le mutazioni e le perdite di sequenze nel genoma di ASFV tra i diversi genotipi o tra ceppi diversi nello stesso genotipo possono portare a differenze importanti che riguardo la virulenza e l'antigenicità. (Bao et al., 2019) Servono ulteriori studi anche sull'abilità dei LAVs di indurre una risposta immunitaria protettiva crociata.

Vaccini prodotti con ingegneria genetica

Vaccini a subunità/ vaccini a DNA /vaccini a vettore

I vaccini a subunità sono emersi di recente come strategia promettente nella lotta alla PSA.

Questa tipologia di vaccini utilizza proteine ricombinanti purificate o peptidi sintetici che codificano per epitopi virali specifici in grado di indurre una risposta immunitaria protettiva. Questo risultato si ottiene utilizzando tecnologie biochimiche convenzionali o a DNA ricombinante per generare un antigene che viene poi formulato con un adiuvante.

In alternativa la tecnologia può essere utilizzata per generare un plasmide o un virus vivo a vettore ricombinante che contiene il DNA che codifica per l'/gli antigene/i che interessa siano espressi in vivo.

Questi vaccini a DNA o a vettore virale hanno il vantaggio, rispetto alle formulazioni inattivate basate su un antigene, di essere in grado di indurre risposte immunitarie cellulo-mediate.

Inoltre i vettori virali hanno l'ulteriore prerogativa di essere in grado di penetrare attivamente nelle cellule dell'ospite e replicare come un vaccino vivo attenuato (LAV) oltre ad essere adatti per differenziare gli animali infetti da quelli vaccinati (DIVA) con immunogeni codificati dal vettore che fungono da markers del vaccino. (Urbano & Ferreira, 2022)

Oggi per ampliare la protezione contro diverse varianti del virus i vaccini contro la PSA possono impiegare la strategia di cross-immunizzazione. Questa strategia consiste nell'utilizzare una combinazione di antigeni di ASFV in un unico vaccino per l'immunizzazione primaria e il booster. Attraverso l'utilizzo di vettori poxvirus e adenovirus sono stati costruiti vaccini ricombinanti contenenti gli antigeni maggiormente utilizzati: p72, p30, p54, E183L, E199L, EP153R, F317 e MGF505-5R.

Secondo Freitas et al. la combinazione più efficace di vettori virali per vaccinare i suini contro la PSA è rappresentata da una immunizzazione primaria con poxvirus ricombinante e un richiamo con adenovirus ricombinante; questo schema vaccinale sembra proteggere i suini dall'esposizione al ceppo Benin 97/1 (Freitas et al., 2019)

Le prospettive future per lo sviluppo di vaccini a vettore contro la PSA prevedono il ricorso a tecnologie emergenti come la ricombinazione genica, la genetica inversa e l'editing genico CRISP/Cas9.

Sarà necessario incoraggiare l'identificazione di geni di virulenza del virus, geni funzionali per la replicazione virale e geni che regolano la risposta immunitaria dell'ospite per migliorare le proposte. Secondo la valutazione finale di Zhang et al. sarà possibile combinare diversi vettori virali e antigeni protettivi efficienti per sviluppare vaccini ricombinanti vettoriali o vaccini a DNA che siano sicuri ed efficaci. (H. Zhang, Zhao, Zhang, Qin, et al., 2023)

MISURE DI CONTROLLO E PREVENZIONE: BIOSICUREZZA

La Peste Suina Africana (PSA) è una malattia devastante per il comparto suinicolo globale e, sfortunatamente, l'Europa sta affrontando la diffusione della malattia da decenni. (Bergmann et al., 2021)

Con l'eccezione di due incursioni di PSA risolte, di cui una nella Repubblica Ceca (Cukor et al., 2020) e una in Belgio (Linden et al., 2019), la diffusione della malattia è stata finora molto difficile da controllare nell'attuale quadro europeo.

La presenza di PSA in una regione danneggia gravemente la produzione e l'economia suinicola, interrompe il commercio di suini e di prodotti a base di carne e può persino incidere sul benessere sociale (L. K. Dixon et al., 2019; Sánchez-Cordón et al., 2018) oltre che sul benessere animale.

Solide pratiche di biosicurezza sono fondamentali per limitare l'impatto della malattia sull'industria e prendere delle decisioni informate e basate sul rischio è necessario non solo per indirizzare le risorse limitate per il controllo della PSA nelle regioni colpite, ma anche per proteggere le regioni indenni dalle nuove introduzioni di PSA.

Sebbene attualmente non sia disponibile un vaccino contro la PSA sufficientemente protettivo (L. K. Dixon et al., 2019) lo sviluppo e l'inclusione di strategie di vaccinazione nei futuri programmi di controllo della PSA dovrebbero essere considerati sulla base di principi basati sul rischio (L. K. Dixon et al., 2020; M.-L. Penrith et al., 2021), massimizzando così l'efficacia dei vaccini che potrebbero essere disponibili in futuro (Borca, Rai, et al., 2021).

Nel loro insieme queste considerazioni evidenziano la necessità di identificare e mitigare i fattori di rischio della diffusione della PSA in Europa (Bellini et al., 2021). Occorre considerare l'attuale situazione epidemiologica, gli ospiti predominanti della malattia, i potenziali vettori patogeni o "veicoli" che potrebbero incrementare la diffusione di PSA, oltre al contesto ambientale.

Le modalità attraverso le quali la biosicurezza aiuta a combattere la PSA in Europa sono così schematizzate:

- Prevenzione dell'introduzione: misure di biosicurezza come recinzione degli allevamenti, controllo dell'accesso dei veicoli e impiego di disinfettanti mirano a impedire che il virus penetri negli allevamenti di suini.
- Limitazione della diffusione all'interno degli allevamenti: pratiche come l'isolamento dei soggetti appena arrivati, il mantenimento di una buona igiene e l'utilizzo di indumenti e attrezzature dedicate ad ogni area dell'allevamento aiutano a prevenire la trasmissione del virus tra gli animali all'interno di queste realtà.
- Controllo delle popolazioni di cinghiali: i cinghiali possono fungere da serbatoio per la PSA. Le misure di biosicurezza includono la recinzione dei confini, i programmi di caccia e i protocolli di smaltimento delle carcasse per limitare la diffusione del virus tra questi soggetti.

Come presentato nella review di Sauter-Louis et al. negli Stati baltici e in Polonia la PSA si è diffusa principalmente attraverso la migrazione dei cinghiali ma anche attraverso le attività umane. Le trasmissioni su grandi distanze (salti) erano ovviamente dovute ad attività umane

(probabilmente smaltimento improprio di rifiuti alimentari contaminati) come descritto per diversi paesi (Chenais et al., 2018; Guinat et al., 2016; Ojševskis et al., 2016)

La diffusione locale della PSA tra i cinghiali non è stata così rapida come originariamente previsto (Schulz, Conraths, et al., 2019). I modelli hanno dimostrato che la presenza di habitat idonei per i cinghiali è un fattore predittivo migliore per il rischio di introduzione della PSA rispetto alla densità di popolazione degli stessi (Bosch, Iglesias, et al., 2017; Bosch, Rodríguez, et al., 2017; De la Torre et al., 2015). Pertanto i modelli che utilizzano dati ambientali si sono rivelati uno strumento utile per stimare il rischio di introduzione della PSA nelle popolazioni di cinghiali naïve (O'Neill et al., 2020).

Diversi modelli (Halasa et al., 2019; Lange & Thulke, 2017; Pepin et al., 2020) hanno evidenziato che la presenza di carcasse di cinghiali infette potrebbe spiegare la trasmissione e la diffusione osservate nelle reali epidemie di PSA.

Pepino et al. (Pepin et al., 2020) hanno esaminato la probabilità di trasmissione del virus della PSA dalle carcasse infette agli animali vivi. Utilizzando i dati provenienti dalla Polonia orientale e applicando un modello epidemiologico meccanicistico spazialmente esplicito, i ricercatori hanno stimato che il 53-66% degli eventi di trasmissione di ASFV potrebbero essere dovuti alla presenza di queste carcasse contaminate. Questa modalità di trasmissione è ritenuta essere un fattore preponderante nel mantenimento e nella persistenza della PSA tra la popolazione di cinghiali (Pepin et al., 2020). Questi dati sono corroborati dalla valutazione dei lunghi periodi durante i quali il virus della PSA può rimanere infettivo nelle carcasse (Cukor et al., 2020; Zani et al., 2020)

Un altro dato risultante da questo modello (Pepin et al., 2020) è che la trasmissione basata sulla presenza di carcasse diventa più importante quanto più bassa è la densità dei cinghiali in un'area poiché si prevede che i contatti diretti diventeranno meno frequenti.

La sorveglianza della PSA nei cinghiali viene effettuata in modalità attiva e passiva. Diversi studi hanno dimostrato che la sorveglianza passiva delle carcasse di cinghiale ha un'efficacia superiore della sorveglianza attiva nel rilevare la presenza di PSA nei cinghiali (Nurmoja, Schulz, et al., 2017; Ojševskis et al., 2016, 2020; Z. , Pejsak et al., 2018; Schulz, Ojševskis, et al., 2019; Schulz, Staubach, et al., 2019, 2020; Śmietanka et al., 2016)

Anche i cinghiali uccisi in incidenti stradali dovrebbero essere campionati nell'interesse di una diagnosi precoce di PSA. Almeno durante le prime fasi di un'epidemia la prevalenza di cinghiali morti positivi ad ASFV (solitamente determinata mediante PCR, cioè rilevamento del genoma della PSA) è molto più elevata della sieroprevalenza (cioè animali con anticorpi specifici della PSA) nei soggetti cacciati (Chenais et al., 2019; Depner et al., 2017; Nurmoja, Schulz, et al., 2017; Schulz, Conraths, et al., 2020; Schulz, Masiulis, et al., 2021; Schulz, Oļševskis, et al., 2019; Schulz, Staubach, et al., 2019).

Un altro fattore riguardante l'importanza dell'ospite cinghiale è la stagionalità. Negli Stati baltici e in Polonia i picchi nel rilevamento della PSA nei cinghiali sono stati osservati durante l'estate ma anche alla fine dell'inverno (febbraio e marzo) (Oļševskis et al., 2016; Woźniakowski et al., 2016). In Lituania la prevalenza è stata più elevata in autunno che in primavera (Pautienius et al., 2018) ed in inverno (Mačiulskis et al., 2020). In Estonia il numero più alto di campioni positivi prelevati da carcasse di cinghiali è stato registrato durante l'inverno (Schulz, Staubach, et al., 2020). In Lettonia non è stata rilevata alcuna stagionalità nella comparsa della PSA nei cinghiali (Schulz, Oļševskis, et al., 2019). Finora non è stato completamente chiarito se gli effetti stagionali osservati siano dovuti alla maggiore abbondanza di cinghiali (in estate), all'aumento dell'attività venatoria (in inverno) o ad altri fattori finora sconosciuti.

Il numero di casi di PSA registrati nei cinghiali negli Stati baltici e in Polonia ha superato di gran lunga i focolai registrati nei suini domestici (Lu et al., 2019). La situazione della PSA nella Repubblica Ceca e in Belgio ha mostrato alcune somiglianze ma anche differenze con quella degli Stati baltici e della Polonia. A differenza delle molteplici incursioni nella popolazione di cinghiali vicino al confine dei paesi vicini, la Repubblica Ceca e il Belgio hanno sperimentato introduzioni focali o puntuali di PSA nelle popolazioni di cinghiali in regioni a più di 300 km di distanza dalle aree note affette da PSA. Va sottolineato che in entrambi i Paesi sono stati colpiti solo i cinghiali. Nonostante l'elevata densità di cinghiali nella Repubblica Ceca la PSA si è diffusa con una velocità di circa 0,5 km/mese, cioè più lentamente che negli Stati Baltici e in Polonia (Sauter-Louis et al., 2021).

Nella Repubblica Ceca le carcasse positive alla PSA sono state trovate a distanze maggiori dalle strade e dai margini delle foreste rispetto alle carcasse negative alla PSA (Cukor et al., 2020).

Analogamente alla Repubblica Ceca, l'introduzione della PSA nei cinghiali in Belgio nel 2018 è stata presumibilmente causata dall'attività umana. La malattia si diffuse più rapidamente nelle foreste che all'esterno delle stesse (Dellicour et al., 2020).

La situazione della PSA in Romania è dominata da focolai negli allevamenti di suini domestici di tutte le dimensioni, per cui le infezioni nei cinghiali potrebbero effettivamente rappresentare eventi di ricaduta dal settore dei suini domestici (Anette et al., 2020).

Si sospetta anche che il mancato rispetto da parte dell'uomo dei requisiti di biosicurezza sia la fonte iniziale di introduzione in popolazioni di cinghiali precedentemente esenti da PSA in Polonia, Ungheria, Repubblica Ceca e Belgio (Sauter-Louis et al., 2021).

Una volta che la PSA è stata introdotta in un'area precedentemente indenne la malattia può diffondersi tra i cinghiali attraverso le vie di trasmissione attualmente riconosciute. Queste includono l'interazione diretta tra suini e il contatto indiretto attraverso carcasse di cinghiali morti a causa della malattia e della contaminazione ambientale (Morelle et al., 2019; PENRITH et al., 2004; Zani et al., 2018). In particolare la via di trasmissione mediata dalla carcassa sembra rappresentare un meccanismo caratteristico di diffusione della PSA proprio dell'attuale contesto europeo (C. Alonso et al., 2018; Frant et al., 2020; Schulz, Ožševskis, et al., 2019; Sehl et al., 2020; Zani et al., 2018).

La persistenza ambientale del virus PSA nella carcassa in decomposizione è considerata una fonte di infezione per i cinghiali (Schulz, Ožševskis, et al., 2019; Sehl et al., 2020).

E' stata proprio l'osservazione della diffusione della PSA tra i cinghiali e la valutazione dei fattori ambientali caratteristici dell'attuale scenario europeo a portare alla descrizione del ciclo di trasmissione del virus "cinghiale-habitat" (Nurmoja, Petrov, et al., 2017; Pikalo et al., 2020) .

Sembra quindi giusto concludere che i cinghiali svolgono un ruolo preponderante nella diffusione e nella persistenza della PSA in Europa. La complessa biologia dei cinghiali e i fattori ambientali che influenzano l'habitat dovrebbero quindi essere al centro degli sforzi di controllo della PSA (Pepin et al., 2020).

Si prevede che una conoscenza approfondita dei fattori ambientali di rischio nei cinghiali possa aiutare a spiegare le dinamiche di diffusione della PSA, i rischi di incursione e propagazione, ma anche fornire informazioni critiche sull'allocazione delle risorse e sullo sviluppo di strategie per

la sorveglianza e il controllo della malattia nei selvatici, così come affrontato nello studio di Bergmann et al. (Bergmann et al., 2021)

Come fattori chiave di rischio ambientale in questo studio sono stati considerati modelli stagionali, copertura forestale, presenza di acqua, presenza umana, attività agricole, densità di cinghiali e vicinanza di altri casi di PSA. Lo studio evidenzia incoerenze in alcune di queste associazioni tra fattori di rischio e il rilevamento della malattia nello spazio e nel tempo ma l'analisi dei parametri considerati può fungere da spunto per la costruzione di nuovi modelli epidemiologici che possano contribuire alla lotta contro la PSA in futuro.

La PSA nei cinghiali si è rivelata estremamente difficile da controllare (Schulz, Oļševskis, et al., 2019). Le misure proposte tra cui lo spopolamento massiccio delle aree colpite e la rimozione delle carcasse di cinghiali sono state considerate a lungo non fattibili o, per quanto riguarda lo spopolamento di massa, non etiche. D'altro parte le misure che potrebbero avere un effetto a lungo termine sui cinghiali e quindi sull'eliminazione della PSA, potrebbero richiedere diversi anni per diventare efficaci e devono essere applicate in aree più vaste. La conclusione di diversi modelli è proprio che solo una combinazione di queste misure, compresi lo spopolamento e la rimozione delle carcasse, potrebbe rappresentare la soluzione più efficace e fattibile ("African Swine Fever," 2015)(Sauter-Louis et al., 2021).

È inoltre interessante e generalmente accettato che la sorveglianza passiva (esecuzione di test su tutti i cinghiali trovati morti o abbattuti) sia più adatta per la diagnosi precoce della malattia rispetto alla sorveglianza attiva (il test sui cinghiali cacciati) (Frant et al., 2017; Guinat et al., 2017; Nurmoja, Schulz, et al., 2017; Schulz, Conraths, et al., 2019, 2020; Schulz, Oļševskis, et al., 2019; Schulz, Staubach, et al., 2019).

CONCLUSIONE

La diffusione della PSA in Europa negli ultimi anni è stata rapida e inarrestabile.

Il virus ha colpito sia i suini domestici che i cinghiali selvatici con gravi conseguenze economiche e sociali in tutta l'Unione Europea.

La sua natura altamente contagiosa e la mancanza di un vaccino efficace rendono la PSA una minaccia persistente per l'industria suinicola mondiale.

La popolazione di cinghiali selvatici rappresenta un importante serbatoio per il virus ed è principalmente responsabile della persistenza della PSA in Europa. L'abitudine dei cinghiali di spostarsi su ampie aree facilita la trasmissione della malattia anche ai suini domestici oltre che ai cinghiali che compiono spostamenti transfrontalieri. Il fattore che impedisce l'eradicazione della patologia dal territorio europeo sembra essere però legato soprattutto alla presenza di carcasse di cinghiali infette sul territorio, oltre al fattore umano. La gestione efficace della popolazione di cinghiali è fondamentale per il controllo della PSA così come lo sono la sorveglianza passiva e la ricerca ed eliminazione delle carcasse infette disseminate nell'ambiente, fonte costante di contagio.

Lo sviluppo di un vaccino efficace contro la PSA è una priorità per la ricerca scientifica. Tuttavia la complessità del virus e la sua elevata variabilità genetica rendono questo obiettivo sfidante. Attraverso l'ausilio di nuove tecnologie si potrebbe accelerare lo sviluppo di un vaccino sicuro ed efficace e ad oggi alcuni risultati appaiono promettenti.

Il ruolo di spicco nella gestione dell'epidemia spetta alle misure di biosicurezza. La loro applicazione negli allevamenti suini è fondamentale per prevenire l'introduzione e la diffusione del virus. L'educazione degli allevatori e il coinvolgimento di tutti gli attori della filiera suinicola sono cruciali per il successo di queste misure.

La lotta contro la PSA richiede un impegno a lungo termine e una collaborazione tra tutti gli Stati a livello europeo. La ricerca scientifica, la gestione efficace della fauna selvatica, l'implementazione di rigorose misure di biosicurezza e la comunicazione efficace sono gli strumenti chiave per contrastare questa minaccia e proteggere l'industria suinicola europea.

BIBLIOGRAFIA

- 3tre3. (2019). *La Moldavia conferma nuovi focolai di PSA, peste suina africana, nei cinghiali*.
- 3tre3. (2024). *PSA Italia: aggiornamento al 7 marzo 2024*.
- Acharya, K. P., & Wilson, R. T. (2020). Pig production is at risk from African Swine Fever (ASF) in Nepal. *Transboundary and Emerging Diseases*, 67(6), 2269–2270. <https://doi.org/10.1111/tbed.13720>
- Achenbach, J. E., Gallardo, C., Nieto-Pelegrín, E., Rivera-Arroyo, B., Degefa-Negi, T., Arias, M., Jenberie, S., Mulisa, D. D., Gizaw, D., Gelaye, E., Chibssa, T. R., Belaye, A., Loitsch, A., Forsa, M., Yami, M., Diallo, A., Soler, A., Lamien, C. E., & Sánchez-Vizcaíno, J. M. (2017). Identification of a New Genotype of African Swine Fever Virus in Domestic Pigs from Ethiopia. *Transboundary and Emerging Diseases*, 64(5), 1393–1404. <https://doi.org/10.1111/tbed.12511>
- Afonso, C. L., Piccone, M. E., Zaffuto, K. M., Neilan, J., Kutish, G. F., Lu, Z., Balinsky, C. A., Gibb, T. R., Bean, T. J., Zsak, L., & Rock, D. L. (2004). African Swine Fever Virus Multigene Family 360 and 530 Genes Affect Host Interferon Response. *Journal of Virology*, 78(4), 1858–1864. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.4.1858-1864.2004>
- African swine fever. (2015). *EFSA Journal*, 13(7). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.4163>
- Agüero, M., Fernández, J., Romero, L. J., Zamora, M. J., Sánchez, C., Belák, S., Arias, M., & Sánchez-Vizcaíno, J. M. (2004). A highly sensitive and specific gel-based multiplex RT-PCR assay for the simultaneous and differential diagnosis of African swine fever and Classical swine fever in clinical samples. *Veterinary Research*, 35(5), 551–563. <https://doi.org/10.1051/vetres:2004031>
- Agüero, M., Fernández, J., Romero, L., Sánchez Mascaraque, C., Arias, M., & Sánchez-Vizcaíno, J. M. (2003). Highly Sensitive PCR Assay for Routine Diagnosis of African Swine Fever Virus in Clinical Samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(9), 4431–4434. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.9.4431-4434.2003>
- Alcamí, A., Carrascosa, A. L., & Viñuela, E. (1990). Interaction of African swine fever virus with macrophages. *Virus Research*, 17(2), 93–104. [https://doi.org/10.1016/0168-1702\(90\)90071-I](https://doi.org/10.1016/0168-1702(90)90071-I)
- Alejo, A., Matamoros, T., Guerra, M., & Andrés, G. (2018). A Proteomic Atlas of the African Swine Fever Virus Particle. *Journal of Virology*, 92(23). <https://doi.org/10.1128/JVI.01293-18>
- Alexandrov T., Kamenov P., & Depner K. (2011). Surveillance and control of classical swine fever in Bulgaria, a country with a high proportion of non-professional pig holdings. *Open Agrar*. 2011;59:140–142.
- Alonso, C., Borca, M., Dixon, L., Revilla, Y., Rodriguez, F., & Escribano, J. M. (2018). ICTV Virus Taxonomy Profile: Asfarviridae. *Journal of General Virology*, 99(5), 613–614. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001049>
- Alonso, F., Domínguez, J., Viñuela, E., & Revilla, Y. (1997). African swine fever virus-specific cytotoxic T lymphocytes recognize the 32 kDa immediate early protein (vp32). *Virus Research*, 49(2), 123–130. [https://doi.org/10.1016/S0168-1702\(97\)01459-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1702(97)01459-7)
- Álvarez, J., Bicout, D., Boklund, A., Bøtner, A., Depner, K., More, S. J., Roberts, H., Stahl, K., Thulke, H., Viltrop, A., Antoniou, S., Cortiñas Abrahantes, J., Dhollander, S., Gogin, A., Papanikolaou, A., Van der Stede, Y.,

- González Villeta, L. C., & Gortázar Schmidt, C. (2019). Research gap analysis on African swine fever. *EFSA Journal*, 17(8). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5811>
- Anderson, E. C., Hutchings, G. H., Mukarati, N., & Wilkinson, P. J. (1998). African swine fever virus infection of the bushpig (*Potamochoerus porcus*) and its significance in the epidemiology of the disease. *Veterinary Microbiology*, 62(1), 1–15. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(98\)00187-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(98)00187-4)
- Andrés, G., Alejo, A., Salas, J., & Salas, M. L. (2002). African Swine Fever Virus Polyproteins pp220 and pp62 Assemble into the Core Shell. *Journal of Virology*, 76(24), 12473–12482. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.24.12473-12482.2002>
- Andrés, G., Alejo, A., Simón-Mateo, C., & Salas, M. L. (2001). African Swine Fever Virus Protease, a New Viral Member of the SUMO-1-specific Protease Family. *Journal of Biological Chemistry*, 276(1), 780–787. <https://doi.org/10.1074/jbc.M006844200>
- Andrés, G., Charro, D., Matamoros, T., Dillard, R. S., & Abrescia, N. G. A. (2020). The cryo-EM structure of African swine fever virus unravels a unique architecture comprising two icosahedral protein capsids and two lipoprotein membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 295(1), 1–12. <https://doi.org/10.1074/jbc.AC119.011196>
- Andrés, G., Simón-Mateo, C., & Viñuela, E. (1997). Assembly of African swine fever virus: role of polyprotein pp220. *Journal of Virology*, 71(3), 2331–2341. <https://doi.org/10.1128/jvi.71.3.2331-2341.1997>
- Anette, B., Anette, B., Theodora, C. V., Klaus, D., Daniel, D., Vittorio, G., Georgina, H., Daniela, K., Annick, L., Aleksandra, M., Simon, M., Edvins, O., Sasa, O., Helen, R., Mihaela, S., Karl, S., Hans-Hermann, T., Grigaliuniene, V., Arvo, V., ... Christian, G. S. (2020). Epidemiological analyses of African swine fever in the European Union (November 2018 to October 2019). *EFSA Journal*, 18(1). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.5996>
- Angulo, A., Viñuela, E., & Alcamí, A. (1993). Inhibition of African swine fever virus binding and infectivity by purified recombinant virus attachment protein p12. *Journal of Virology*, 67(9), 5463–5471. <https://doi.org/10.1128/jvi.67.9.5463-5471.1993>
- Argilaguët, J. M., Pérez-Martín, E., Gallardo, C., Salguero, F. J., Borrego, B., Lacasta, A., Accensi, F., Díaz, I., Nofrarías, M., Pujols, J., Blanco, E., Pérez-Filgueira, M., Escribano, J. M., & Rodríguez, F. (2011). Enhancing DNA immunization by targeting ASFV antigens to SLA-II bearing cells. *Vaccine*, 29(33), 5379–5385. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.05.084>
- Argilaguët, J. M., Pérez-Martín, E., Nofrarías, M., Gallardo, C., Accensi, F., Lacasta, A., Mora, M., Ballester, M., Galindo-Cardiel, I., López-Soria, S., Escribano, J. M., Reche, P. A., & Rodríguez, F. (2012). DNA Vaccination Partially Protects against African Swine Fever Virus Lethal Challenge in the Absence of Antibodies. *PLoS ONE*, 7(9), e40942. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040942>
- Arias, M., De la Torre, A., & Dixon, L. (2017). *Blueprint and Roadmap (BRMP) on the possible development of an African Swine Fever (ASF) vaccine [Internet]. Brussels; 2017.*

- Arias, M., de la Torre, A., Dixon, L., Gallardo, C., Jori, F., Laddomada, A., Martins, C., Parkhouse, R. M., Revilla, Y., Rodriguez, F. and J.-M., & Sanchez-Vizcaino. (2017). Approaches and Perspectives for Development of African Swine Fever Virus Vaccines. *Vaccines*, 5(4), 35. <https://doi.org/10.3390/vaccines5040035>
- Arias, M., Jurado, C., Gallardo, C., Fernández-Pinero, J., & Sánchez-Vizcaíno, J. M. (2018). Gaps in African swine fever: Analysis and priorities. *Transboundary and Emerging Diseases*, 65, 235–247. <https://doi.org/10.1111/tbed.12695>
- Arias, M., & Sánchez-Vizcaíno, J. M. (2002). African Swine Fever Eradication: The Spanish Model. In *Trends in Emerging Viral Infections of Swine* (pp. 133–139). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9780470376812.ch4c>
- Arias ML, Escribano JM, Rueda A, & Sanchez-Vizcaino JM. (1986). La peste porcina africana. *Med Veterinaire*. (1986) 3:333–50.
- Baños, J. V., Boklund, A., Gogin, A., Gortázar, C., Guberti, V., Helyes, G., Kantere, M., Korytarova, D., Linden, A., Masiulis, M., Miteva, A., Neghirla, I., Oļševskis, E., Ostojic, S., Petr, S., Staubach, C., Thulke, H., Viltrop, A., Wozniakowski, G., ... Ståhl, K. (2022). Epidemiological analyses of African swine fever in the European Union. *EFSA Journal*, 20(5). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7290>
- Bao, J., Wang, Q., Lin, P., Liu, C., Li, L., Wu, X., Chi, T., Xu, T., Ge, S., Liu, Y., Li, J., Wang, S., Qu, H., Jin, T., & Wang, Z. (2019). Genome comparison of African swine fever virus China/2018/Anhui <sc>XCGQ</sc> strain and related European p72 Genotype <sc>II</sc> strains. *Transboundary and Emerging Diseases*, 66(3), 1167–1176. <https://doi.org/10.1111/tbed.13124>
- Barasona, J. A., Cadenas-Fernández, E., Kosowska, A., Barroso-Arévalo, S., Rivera, B., Sánchez, R., Porras, N., Gallardo, C., & Sánchez-Vizcaíno, J. M. (2021). Safety of African Swine Fever Vaccine Candidate Lv17/WB/Rie1 in Wild Boar: Overdose and Repeated Doses. *Frontiers in Immunology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.761753>
- Barasona, J. A., Gallardo, C., Cadenas-Fernández, E., Jurado, C., Rivera, B., Rodríguez-Bertos, A., Arias, M., & Sánchez-Vizcaíno, J. M. (2019). First Oral Vaccination of Eurasian Wild Boar Against African Swine Fever Virus Genotype II. *Frontiers in Veterinary Science*, 6. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00137>
- Basto, A. P., Nix, R. J., Boinas, F., Mendes, S., Silva, M. J., Cartaxeiro, C., Portugal, R. S., Leitão, A., Dixon, L. K., & Martins, C. (2006). Kinetics of African swine fever virus infection in *Ornithodoros erraticus* ticks. *Journal of General Virology*, 87(7), 1863–1871. <https://doi.org/10.1099/vir.0.81765-0>
- Basto, A. P., Portugal, R. S., Nix, R. J., Cartaxeiro, C., Boinas, F., Dixon, L. K., Leitão, A., & Martins, C. (2006). Development of a nested PCR and its internal control for the detection of African swine fever virus (ASFV) in *Ornithodoros erraticus*. *Archives of Virology*, 151(4), 819–826. <https://doi.org/10.1007/s00705-005-0654-2>
- Bastos, A. D. S., Penrith, M.-L., Crucière, C., Edrich, J. L., Hutchings, G., Roger, F., Couacy-Hymann, E., & R.Thomson, G. (2003). Genotyping field strains of African swine fever virus by partial p72 gene characterisation. *Archives of Virology*, 148(4), 693–706. <https://doi.org/10.1007/s00705-002-0946-8>

- Bautista, M. J., Villamandos, J. G., Carrasco, L., Villamor, E. R., Salguero, F. J., & Sierra, M. A. (1998). Ultrastructural pathology of the bone marrow in pigs inoculated with a moderately virulent strain (DR'78) of African swine fever virus. *Histology and Histopathology*, *13*(3), 713-720.
- Beato, M. S., D'Errico, F., Iscaro, C., Petrini, S., Giammarioli, M., & Feliziani, F. (2022). Disinfectants against African Swine Fever: An Updated Review. *Viruses*, *14*(7), 1384. <https://doi.org/10.3390/v14071384>
- Bech-Nielsen, S., Fernandez, J., Martinez-Pereda, F., Espinosa, J., Perez Bonilla, Q., & Sanchez-Vizcaino, J. M. (1995). A case study of an outbreak of African swine fever in Spain. *British Veterinary Journal*, *151*(2), 203–214. [https://doi.org/10.1016/S0007-1935\(95\)80012-3](https://doi.org/10.1016/S0007-1935(95)80012-3)
- Belgian Federal Agency for the Safety of the Food Chain (FASFC). (n.d.). *African swine fever (ASF) virus in wild boars in Belgium: Update of the situation*.
- Bellini, S., Casadei, G., De Lorenzi, G., & Tamba, M. (2021). A Review of Risk Factors of African Swine Fever Incursion in Pig Farming within the European Union Scenario. *Pathogens*, *10*(1), 84. <https://doi.org/10.3390/pathogens10010084>
- Bergmann, H., Schulz, K., Conraths, F. J., & Sauter-Louis, C. (2021). A Review of Environmental Risk Factors for African Swine Fever in European Wild Boar. *Animals*, *11*(9), 2692. <https://doi.org/10.3390/ani11092692>
- Biondi, V., Monti, S., Landi, A., Pugliese, M., Zema, E., & Passantino, A. (2022). Has the Spread of African Swine Fever in the European Union Been Impacted by COVID-19 Pandemic? *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *19*(9), 5360. <https://doi.org/10.3390/ijerph19095360>
- Biront, P., Castryck, F., & Leunen, J. (1987). An epizootic of African swine fever in Belgium and its eradication. *Veterinary Record*, *120*(18), 432–434. <https://doi.org/10.1136/vr.120.18.432>
- Blome, S., Gabriel, C., & Beer, M. (2013). Pathogenesis of African swine fever in domestic pigs and European wild boar. *Virus Research*, *173*(1), 122–130. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.10.026>
- Blome, S., Gabriel, C., & Beer, M. (2014). Modern adjuvants do not enhance the efficacy of an inactivated African swine fever virus vaccine preparation. *Vaccine*, *32*(31), 3879–3882. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.05.051>
- Blome, S., Gabriel, C., Dietze, K., Breithaupt, A., & Beer, M. (2012). High Virulence of African Swine Fever Virus Caucasus Isolate in European Wild Boars of All Ages. *Emerging Infectious Diseases*, *18*(4). <https://doi.org/10.3201/eid1804.111813>
- Blome, S., Goller, K. V., Petrov, A., Dräger, C., Pietschmann, J., & Beer, M. (2014). Alternative sampling strategies for passive classical and African swine fever surveillance in wild boar – Extension towards African swine fever virus antibody detection. *Veterinary Microbiology*, *174*(3–4), 607–608. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.09.018>
- Blome, S., Staubach, C., Henke, J., Carlson, J., & Beer, M. (2017). Classical Swine Fever—An Updated Review. *Viruses*, *9*(4), 86. <https://doi.org/10.3390/v9040086>

- Bocian, Ł., Frant, M., Ziętek-Barszcz, A., Niemczuk, K., & Szczotka-Bochniarz, A. (2022). Dynamics of the African swine fever spread in Poland. *Journal of Veterinary Research*, *66*(4), 459–471. <https://doi.org/10.2478/jvetres-2022-0067>
- Boinas, F. S., Hutchings, G. H., Dixon, L. K., & Wilkinson, P. J. (2004). Characterization of pathogenic and non-pathogenic African swine fever virus isolates from *Ornithodoros erraticus* inhabiting pig premises in Portugal. *Journal of General Virology*, *85*(8), 2177–2187. <https://doi.org/10.1099/vir.0.80058-0>
- Boinas, F. S., Wilson, A. J., Hutchings, G. H., Martins, C., & Dixon, L. J. (2011). The Persistence of African Swine Fever Virus in Field-Infected *Ornithodoros erraticus* during the ASF Endemic Period in Portugal. *PLoS ONE*, *6*(5), e20383. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020383>
- Boklund, A., Cay, B., Depner, K., Földi, Z., Guberti, V., Masiulis, M., Miteva, A., More, S., Olsevskis, E., Šatrán, P., Spiridon, M., Stahl, K., Thulke, H., Viltrop, A., Wozniakowski, G., Broglia, A., Cortinas Abrahantes, J., Dhollander, S., Gogin, A., ... Gortázar, C. (2018). Epidemiological analyses of African swine fever in the European Union (November 2017 until November 2018). *EFSA Journal*, *16*(11). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5494>
- Boklund, A., Dhollander, S., Chesnoiu Vasile, T., Abrahantes, J. C., Bøtner, A., Gogin, A., Gonzalez Villeta, L. C., Gortázar, C., More, S. J., Papanikolaou, A., Roberts, H., Stegeman, A., Ståhl, K., Thulke, H. H., Viltrop, A., Van der Stede, Y., & Mortensen, S. (2020). Risk factors for African swine fever incursion in Romanian domestic farms during 2019. *Scientific Reports*, *10*(1), 10215. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66381-3>
- Borca, M. V., Holinka, L. G., Berggren, K. A., & Gladue, D. P. (2018). CRISPR-Cas9, a tool to efficiently increase the development of recombinant African swine fever viruses. *Scientific Reports*, *8*(1), 3154. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21575-8>
- Borca, M. V., Rai, A., Ramirez-Medina, E., Silva, E., Velazquez-Salinas, L., Vuono, E., Pruitt, S., Espinoza, N., & Gladue, D. P. (2021). A Cell Culture-Adapted Vaccine Virus against the Current African Swine Fever Virus Pandemic Strain. *Journal of Virology*, *95*(14). <https://doi.org/10.1128/JVI.00123-21>
- Borca, M. V., Ramirez-Medina, E., Silva, E., Vuono, E., Rai, A., Pruitt, S., Espinoza, N., Velazquez-Salinas, L., Gay, C. G., & Gladue, D. P. (2021). ASFV-G-ΔI177L as an Effective Oral Nasal Vaccine against the Eurasia Strain of African Swine Fever. *Viruses*, *13*(5), 765. <https://doi.org/10.3390/v13050765>
- Borca, M. V., Ramirez-Medina, E., Silva, E., Vuono, E., Rai, A., Pruitt, S., Holinka, L. G., Velazquez-Salinas, L., Zhu, J., & Gladue, D. P. (2020). 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 of Virology*, *94*(7). <https://doi.org/10.1128/JVI.02017-19>
- Bosch, J., Iglesias, I., Muñoz, M. J., & de la Torre, A. (2017). A Cartographic Tool for Managing African Swine Fever in Eurasia: Mapping Wild Boar Distribution Based on the Quality of Available Habitats. *Transboundary and Emerging Diseases*, *64*(6), 1720–1733. <https://doi.org/10.1111/tbed.12559>
- Bosch, J., Rodríguez, A., Iglesias, I., Muñoz, M. J., Jurado, C., Sánchez-Vizcaíno, J. M., & de la Torre, A. (2017). Update on the Risk of Introduction of African Swine Fever by Wild Boar into Disease-Free European

- Union Countries. *Transboundary and Emerging Diseases*, 64(5), 1424–1432.
<https://doi.org/10.1111/tbed.12527>
- Bosch-Camós, L., Alonso, U., Esteve-Codina, A., Chang, C.-Y., Martín-Mur, B., Accensi, F., Muñoz, M., Navas, M. J., Dabad, M., Vidal, E., Pina-Pedrero, S., Pleguezuelos, P., Caratù, G., Salas, M. L., Liu, L., Bataklieva, S., Gavrilov, B., Rodríguez, F., & Argilagué, J. (2022). Cross-protection against African swine fever virus upon intranasal vaccination is associated with an adaptive-innate immune crosstalk. *PLOS Pathogens*, 18(11), e1010931. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010931>
- Breese, S. S., & DeBoer, C. J. (1966). Electron microscope observations of African swine fever virus in tissue culture cells. *Virology*, 28(3), 420–428. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(66\)90054-7](https://doi.org/10.1016/0042-6822(66)90054-7)
- Brellou, G. D., Tassis, P. D., Apostolopoulou, E. P., Fortomaris, P. D., Leontides, L. S., Papadopoulos, G. A., & Tzika, E. D. (2021). Report on the First African Swine Fever Case in Greece. *Veterinary Sciences*, 8(8), 163. <https://doi.org/10.3390/vetsci8080163>
- Brookes, S. M., Dixon, L. K., & Parkhouse, R. M. E. (1996). Assembly of African Swine Fever Virus: Quantitative Ultrastructural Analysis in Vitro and in Vivo. *Virology*, 224(1), 84–92.
<https://doi.org/10.1006/viro.1996.0509>
- Brown, A.-A., Penrith, M. L., Fasina, F. O., & Beltran-Alcrudo, D. (2018). The African swine fever epidemic in West Africa, 1996-2002. *Transboundary and Emerging Diseases*, 65(1), 64–76.
<https://doi.org/10.1111/tbed.12673>
- Brown, V. R., & Bevins, S. N. (2018). A Review of African Swine Fever and the Potential for Introduction into the United States and the Possibility of Subsequent Establishment in Feral Swine and Native Ticks. *Frontiers in Veterinary Science*, 5. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00011>
- Brun, A., Rivas, C., Esteban, M., Escribano, J. M., & Alonso, C. (1996). African Swine Fever Virus Gene A179L, a Viral Homologue of bcl-2, Protects Cells from Programmed Cell Death. *Virology*, 225(1), 227–230.
<https://doi.org/10.1006/viro.1996.0592>
- Burmakina, G., Malogolovkin, A., Tulman, E. R., Xu, W., Delhon, G., Kolbasov, D., & Rock, D. L. (2019). Identification of T-cell epitopes in African swine fever virus CD2v and C-type lectin proteins. *Journal of General Virology*, 100(2), 259–265. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001195>
- Burrage, T. G. (2013). African swine fever virus infection in Ornithodoros ticks. *Virus Research*, 173(1), 131–139. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.10.010>
- C., G., I., N., A., S., V., D., A., S., E., M., C., P., R., N., & M., A. (2018). Evolution in Europe of African swine fever genotype II viruses from highly to moderately virulent. *Veterinary Microbiology*, 219, 70–79.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.04.001>
- Cackett, G., Matelska, D., Sýkora, M., Portugal, R., Malecki, M., Bähler, J., Dixon, L., & Werner, F. (2020). The African Swine Fever Virus Transcriptome. *Journal of Virology*, 94(9). <https://doi.org/10.1128/JVI.00119-20>

- Cadenas-Fernández, E., Sánchez-Vizcaíno, J. M., Pintore, A., Denurra, D., Cherchi, M., Jurado, C., Vicente, J., & Barasona, J. A. (2019). Free-Ranging Pig and Wild Boar Interactions in an Endemic Area of African Swine Fever. *Frontiers in Veterinary Science*, *6*. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00376>
- Cadenas-Fernández, E., Sánchez-Vizcaíno, J. M., van den Born, E., Kosowska, A., van Kilsdonk, E., Fernández-Pacheco, P., Gallardo, C., Arias, M., & Barasona, J. A. (2021). High Doses of Inactivated African Swine Fever Virus Are Safe, but Do Not Confer Protection against a Virulent Challenge. *Vaccines*, *9*(3), 242. <https://doi.org/10.3390/vaccines9030242>
- Caixia, W., Songyin, Q., Ying, X., Haoyang, Y., Haoxuan, L., Shaoqiang, W., Chunyan, F., & Xiangmei, L. (2022). Development of a Blocking ELISA Kit for Detection of ASFV Antibody Based on a Monoclonal Antibody Against Full-Length p72. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, *105*(5), 1428–1436. <https://doi.org/10.1093/jaoacint/qsac050>
- Cappai, S., Baldi, I., Desini, P., Pintore, A., Denurra, D., Cherchi, M., Rolesu, S., Mandas, D., Franzoni, G., Fiori, M. S., Oggiano, A., Feliziani, F., Guberti, V., & Loi, F. (2022). Changes in Estimating the Wild Boar Carcasses Sampling Effort: Applying the EFSA ASF Exit Strategy by Means of the WBC-Counter Tool. *Viruses*, *14*(7), 1424. <https://doi.org/10.3390/v14071424>
- Cappai, S., Rolesu, S., Coccollone, A., Laddomada, A., & Loi, F. (2018). Evaluation of biological and socio-economic factors related to persistence of African swine fever in Sardinia. *Preventive Veterinary Medicine*, *152*, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2018.01.004>
- Carlson, J., Fischer, M., Zani, L., Eschbaumer, M., Fuchs, W., Mettenleiter, T., Beer, M., & Blome, S. (2020). Stability of African Swine Fever Virus in Soil and Options to Mitigate the Potential Transmission Risk. *Pathogens*, *9*(11), 977. <https://doi.org/10.3390/pathogens9110977>
- Carlson, J., O'Donnell, V., Alfano, M., Velazquez Salinas, L., Holinka, L., Krug, P., Gladue, D., Higgs, S., & Borca, M. (2016). Association of the Host Immune Response with Protection Using a Live Attenuated African Swine Fever Virus Model. *Viruses*, *8*(10), 291. <https://doi.org/10.3390/v8100291>
- Carlson, J., Zani, L., Schwaiger, T., Nurmoja, I., Viltrop, A., Vilem, A., Beer, M., & Blome, S. (2018). Simplifying sampling for African swine fever surveillance: Assessment of antibody and pathogen detection from blood swabs. *Transboundary and Emerging Diseases*, *65*(1), e165–e172. <https://doi.org/10.1111/tbed.12706>
- Carrasco, L., Bautista, M. J., Gómez-Villamandos, J. C., de Las Mulas, J. M., De Lara, F. C. M., Wilkinson, P. J., & Sierra, M. A. (1997). Development of microscopic lesions in splenic cords of pigs infected with African swine fever virus. *Veterinary Research*, *28*(1), 93-99.
- Carrasco, L., Bautista, M. J., Martín de las Mulas, J., Gómez-Villamandos, J. C., Espinosa de los Monteros, A., & Sierra, M. A. (1995). Description of a new population of fixed macrophages in the splenic cords of pigs. *Journal of Anatomy*, *187* (Pt 2)(Pt 2), 395–402.
- Carrasco, L., Chacón-m de Lara, F., Gómez-Villamandos, J. C., Bautista, M. J., Villeda, C. J., Wilkinson, P. J., & Sierra, M. A. (1996). The pathogenic role of pulmonary intravascular macrophages in acute African swine fever. *Research in Veterinary Science*, *61*(3), 193–198. [https://doi.org/10.1016/S0034-5288\(96\)90062-4](https://doi.org/10.1016/S0034-5288(96)90062-4)

- Carrasco, L., Chacón-m de Lara, F., Martín de las Mulas, J., Gómez-Villamandos, J. C., Sierra, M. A., Villeda, C. J., & Wilkinson, P. J. (1997). Ultrastructural changes related to the lymph node haemorrhages in acute African swine fever. *Research in Veterinary Science*, *62*(3), 199–204. [https://doi.org/10.1016/S0034-5288\(97\)90190-9](https://doi.org/10.1016/S0034-5288(97)90190-9)
- Carrasco, L., Núñez, A., Salguero, F. J., Díaz San Segundo, F., Sánchez-Cordón, P., Gómez-Villamandos, J. C., & Sierra, M. A. (2002). African Swine Fever: Expression of Interleukin-1 alpha and Tumour Necrosis Factor-alpha by Pulmonary Intravascular Macrophages. *Journal of Comparative Pathology*, *126*(2–3), 194–201. <https://doi.org/10.1053/jcpa.2001.0543>
- Carrascosa, A. L., Bustos, M. J., & de Leon, P. (2011). Methods for Growing and Titrating African Swine Fever Virus: Field and Laboratory Samples. *Current Protocols in Cell Biology*, *53*(1). <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb2614s53>
- Carrascosa, JoséL., Carazo, JoséM., Carrascosa, A. L., García, N., Santisteban, A., & Viñuela, E. (1984). General morphology and capsid fine structure of African swine fever virus particles. *Virology*, *132*(1), 160–172. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(84\)90100-4](https://doi.org/10.1016/0042-6822(84)90100-4)
- Chandana, M. S., Nair, S. S., Chaturvedi, V. K., Abhishek, Pal, S., Charan, M. S. S., Balaji, S., Saini, S., Vasavi, K., & Deepa, P. (2024). Recent progress and major gaps in the vaccine development for African swine fever. *Brazilian Journal of Microbiology*, *55*(1), 997–1010. <https://doi.org/10.1007/s42770-024-01264-7>
- Chapman, D. A. G., Darby, A. C., Da Silva, M., Upton, C., Radford, A. D., & Dixon, L. K. (2011). Genomic Analysis of Highly Virulent Georgia 2007/1 Isolate of African Swine Fever Virus. *Emerging Infectious Diseases*, *17*(4), 599–605. <https://doi.org/10.3201/eid1704.101283>
- Chen, W., Zhao, D., He, X., Liu, R., Wang, Z., Zhang, X., Li, F., Shan, D., Chen, H., Zhang, J., Wang, L., Wen, Z., Wang, X., Guan, Y., Liu, J., & Bu, Z. (2020). A seven-gene-deleted African swine fever virus is safe and effective as a live attenuated vaccine in pigs. *Science China Life Sciences*, *63*(5), 623–634. <https://doi.org/10.1007/s11427-020-1657-9>
- Chen, Y., & Lin, J. S. (2017). The application of aptamer in apoptosis. *Biochimie*, *132*, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2016.10.008>
- Chenais, E., Depner, K., Guberti, V., Dietze, K., Viltrop, A., & Ståhl, K. (2019). Epidemiological considerations on African swine fever in Europe 2014–2018. *Porcine Health Management*, *5*(1), 6. <https://doi.org/10.1186/s40813-018-0109-2>
- Chenais, E., Ståhl, K., Guberti, V., & Depner, K. (2018). Identification of Wild Boar–Habitat Epidemiologic Cycle in African Swine Fever Epizootic. *Emerging Infectious Diseases*, *24*(4), 810–812. <https://doi.org/10.3201/eid2404.172127>
- Cheng, J., & Ward, M. P. (2022). Risk factors for the spread of African Swine Fever in China: A systematic review of Chinese-language literature. *Transboundary and Emerging Diseases*, *69*(5). <https://doi.org/10.1111/tbed.14573>
- Cobbold, C., Brookes, S. M., & Wileman, T. (2000). Biochemical Requirements of Virus Wrapping by the Endoplasmic Reticulum: Involvement of ATP and Endoplasmic Reticulum Calcium Store during

- Envelopment of African Swine Fever Virus. *Journal of Virology*, 74(5), 2151–2160.
<https://doi.org/10.1128/JVI.74.5.2151-2160.2000>
- Cobbold, C., Windsor, M., & Wileman, T. (2001). A Virally Encoded Chaperone Specialized for Folding of the Major Capsid Protein of African Swine Fever Virus. *Journal of Virology*, 75(16), 7221–7229.
<https://doi.org/10.1128/JVI.75.16.7221-7229.2001>
- Coggins L. (1966). Growth and certain stability of African swine fever virus. . *Am J Vet Res.* 27:1351–1358.
- Costard, S., Mur, L., Lubroth, J., Sanchez-Vizcaino, J. M., & Pfeiffer, D. U. (2013). Epidemiology of African swine fever virus. *Virus Research*, 173(1), 191–197. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.10.030>
- Costard, S., Wieland, B., de Glanville, W., Jori, F., Rowlands, R., Vosloo, W., Roger, F., Pfeiffer, D. U., & Dixon, L. K. (2009). African swine fever: how can global spread be prevented? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1530), 2683–2696. <https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0098>
- Cross, P. C., Caillaud, D., & Heisey, D. M. (2013). Underestimating the effects of spatial heterogeneity due to individual movement and spatial scale: infectious disease as an example. . *Landscape Ecology*, 28, 247–257.
- Cukor, J., Linda, R., Václavěk, P., Šatrán, P., Mahlerová, K., Vacek, Z., Kunca, T., & Havránek, F. (2020). Wild boar deathbed choice in relation to ASF: Are there any differences between positive and negative carcasses? *Preventive Veterinary Medicine*, 177, 104943.
<https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2020.104943>
- Cwynar, P., Stojkov, J., & Wlazlak, K. (2019). African Swine Fever Status in Europe. *Viruses*, 11(4), 310.
<https://doi.org/10.3390/v11040310>
- D. Beltrán-Alcrudo, M. A. A. C. Gallardo, S. A. Kramer, M. L. Penrith, A. Kamata, & L. Wiersma. (2017). *African swine fever: detection and diagnosis—a manual for veterinarians*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Danzetta, M. L., Marenzoni, M. L., Iannetti, S., Tizzani, P., Calistri, P., & Feliziani, F. (2020). African Swine Fever: Lessons to Learn From Past Eradication Experiences. A Systematic Review. *Frontiers in Veterinary Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00296>
- D’Arcy, M. S. (2019). Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biology International*, 43(6), 582–592. <https://doi.org/10.1002/cbin.11137>
- Davies, K., Goatley, L. C., Guinat, C., Netherton, C. L., Gubbins, S., Dixon, L. K., & Reis, A. L. (2017). Survival of African Swine Fever Virus in Excretions from Pigs Experimentally Infected with the Georgia 2007/1 Isolate. *Transboundary and Emerging Diseases*, 64(2), 425–431. <https://doi.org/10.1111/tbed.12381>
- de Carvalho Ferreira, H. C., Weesendorp, E., Quak, S., Stegeman, J. A., & Loeffen, W. L. A. (2013). Quantification of airborne African swine fever virus after experimental infection. *Veterinary Microbiology*, 165(3–4), 243–251. <https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2013.03.007>
- De la Torre, A., Bosch, J., Iglesias, I., Muñoz, M. J., Mur, L., Martínez-López, B., Martínez, M., & Sánchez-Vizcaino, J. M. (2015). Assessing the Risk of African Swine Fever Introduction into the European Union

- by Wild Boar. *Transboundary and Emerging Diseases*, 62(3), 272–279.
<https://doi.org/10.1111/tbed.12129>
- de León, P., Bustos, M. J., & Carrascosa, A. L. (2013). Laboratory methods to study African swine fever virus. *Virus Research*, 173(1), 168–179. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.09.013>
- de Matos, A. P. A., & Carvalho, Z. G. (1993). African swine fever virus interaction with microtubules. *Biology of the Cell*, 78(3), 229–234. [https://doi.org/10.1016/0248-4900\(93\)90134-Z](https://doi.org/10.1016/0248-4900(93)90134-Z)
- Dee, S. A., Bauermann, F. V., Niederwerder, M. C., Singrey, A., Clement, T., de Lima, M., Long, C., Patterson, G., Sheahan, M. A., Stoian, A. M. M., Petrovan, V., Jones, C. K., De Jong, J., Ji, J., Spronk, G. D., Minion, L., Christopher-Hennings, J., Zimmerman, J. J., Rowland, R. R. R., ... Diel, D. G. (2018). Survival of viral pathogens in animal feed ingredients under transboundary shipping models. *PLOS ONE*, 13(3), e0194509. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194509>
- Dee, S. A., Bauermann, F. V., Niederwerder, M. C., Singrey, A., Clement, T., de Lima, M., Long, C., Patterson, G., Sheahan, M. A., Stoian, A. M. M., Petrovan, V., Jones, C. K., Jong, J. De, Ji, J., Spronk, G. D., Minion, L., Christopher-Hennings, J., Zimmerman, J. J., Rowland, R. R. R., ... Diel, D. G. (2018). Correction: Survival of viral pathogens in animal feed ingredients under transboundary shipping models. *PLOS ONE*, 13(11), e0208130. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208130>
- Dellicour, S., Desmecht, D., Paternostre, J., Malengreaux, C., Licoppe, A., Gilbert, M., & Linden, A. (2020). Unravelling the dispersal dynamics and ecological drivers of the African swine fever outbreak in Belgium. *Journal of Applied Ecology*, 57(8), 1619–1629. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.13649>
- Depner, K., Gortazar, C., Guberti, V., Masiulis, M., More, S., Oļševskis, E., Thulke, H., Viltrop, A., Woźniakowski, G., Cortiñas Abrahantes, J., Gogin, A., Verdonck, F., & Dhollander, S. (2017). Epidemiological analyses of African swine fever in the Baltic States and Poland. *EFSA Journal*, 15(11). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.5068>
- Diaz, A. V., Netherton, C. L., Dixon, L. K., & Wilson, A. J. (2012). African Swine Fever Virus Strain Georgia 2007/1 in *Ornithodoros erraticus* Ticks. *Emerging Infectious Diseases*, 18(6), 1026–1028. <https://doi.org/10.3201/eid1806.111728>
- Dimmock, N. J. (1993). *Neutralization of Animal Viruses* (Vol. 183). Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-77849-0>
- Dixon, L. K., Chapman, D. A. G., Netherton, C. L., & Upton, C. (2013). African swine fever virus replication and genomics. *Virus Research*, 173(1), 3–14. <https://doi.org/10.1016/J.VIRUSRES.2012.10.020>
- Dixon, L. K., Stahl, K., Jori, F., Vial, L., & Pfeiffer, D. U. (2020). African Swine Fever Epidemiology and Control. *Annual Review of Animal Biosciences*, 8(1), 221–246. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-021419-083741>
- Dixon, L. K., Sun, H., & Roberts, H. (2019). African swine fever. *Antiviral Research*, 165, 34–41. <https://doi.org/10.1016/J.ANTIVIRAL.2019.02.018>

- Dixon, L., Sánchez-Cordón, P., Galindo, I., & Alonso, C. (2017). Investigations of Pro- and Anti-Apoptotic Factors Affecting African Swine Fever Virus Replication and Pathogenesis. *Viruses*, *9*(9), 241. <https://doi.org/10.3390/v9090241>
- Dodantenna, N., Ranathunga, L., Chathuranga, W. A. G., Weerawardhana, A., Cha, J.-W., Subasinghe, A., Gamage, N., Haluwana, D. K., Kim, Y., Jheong, W., Poo, H., & Lee, J.-S. (2022). African Swine Fever Virus EP364R and C129R Target Cyclic GMP-AMP To Inhibit the cGAS-STING Signaling Pathway. *Journal of Virology*, *96*(15). <https://doi.org/10.1128/jvi.01022-22>
- Eblé, P. L., Hagenars, T. J., Weesendorp, E., Quak, S., Moonen-Leusen, H. W., & Loeffen, W. L. A. (2019). Transmission of African Swine Fever Virus via carrier (survivor) pigs does occur. *Veterinary Microbiology*, *237*, 108345. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.06.018>
- EFSA. (n.d.). *Scientific Opinion on African swine fever*. 2014.
- Elnagar, A., Pikalo, J., Beer, M., Blome, S., & Hoffmann, B. (2021). Swift and Reliable “Easy Lab” Methods for the Sensitive Molecular Detection of African Swine Fever Virus. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(5), 2307. <https://doi.org/10.3390/ijms22052307>
- Enjuanes, L., Carrascosa, A. L., Moreno, M. A., & Vinuela, E. (1976). Titration of African Swine Fever (ASF) Virus. *Journal of General Virology*, *32*(3), 471–477. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-32-3-471>
- Epifano, C., Krijnse-Locker, J., Salas, M. L., Salas, J., & Rodríguez, J. M. (2006). Generation of Filamentous Instead of Icosahedral Particles by Repression of African Swine Fever Virus Structural Protein pB438L. *Journal of Virology*, *80*(23), 11456–11466. <https://doi.org/10.1128/JVI.01468-06>
- Escribano, J. M., Galindo, I., & Alonso, C. (2013). Antibody-mediated neutralization of African swine fever virus: Myths and facts. *Virus Research*, *173*(1), 101–109. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.10.012>
- European Union. (n.d.). *Easy to read - The European Union*.
- Eurostat. (2014). *Pig farming in the European Union: considerable variations from one Member State to another - Issue number 15/2014*.
- Eustace Montgomery, R. (1921). On A Form of Swine Fever Occurring in British East Africa (Kenya Colony). *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics*, *34*, 159–191. [https://doi.org/10.1016/S0368-1742\(21\)80031-4](https://doi.org/10.1016/S0368-1742(21)80031-4)
- Evaluation of possible mitigation measures to prevent introduction and spread of African swine fever virus through wild boar. (2014). *EFSA Journal*, *12*(3). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2014.3616>
- Faburay, B. (2022). Genome Plasticity of African Swine Fever Virus: Implications for Diagnostics and Live-Attenuated Vaccines. *Pathogens*, *11*(2), 145. <https://doi.org/10.3390/pathogens11020145>
- Fan, L. (2019). Signaling pathways involved in regulating apoptosis induction in host cells upon PRRSV infection. *Virus Genes*, *55*(4), 433–439. <https://doi.org/10.1007/s11262-019-01665-z>
- FAO. (2007). *African Swine Fever in Georgia*. <https://www.fao.org/documents/card/en?details=c33702fd-8cd3-527e-a259-833ad37050d1/>

- FAO, Beltrán-Alcrudo, D., Arias, M., Gallardo, C., Kramer, S., & Penrith, M. L. (2017). *African swine fever: detection and diagnosis – A manual for veterinarians*.
<https://www.fao.org/documents/card/en?details=bd35c569-752e-4b57-892e-e3e2e0ee0c9c>
- Farlow, J., Donduashvili, M., Kokhraidze, M., Kotorashvili, A., Vepkhvadze, N. G., Kotaria, N., & Gulbani, A. (2018). Intra-epidemic genome variation in highly pathogenic African swine fever virus (ASFV) from the country of Georgia. *Virology Journal*, *15*(1), 190. <https://doi.org/10.1186/s12985-018-1099-z>
- Fernández de Marco, M., Salguero, F. J., Bautista, M. J., Núñez, A., Sánchez-Cordón, P. J., & Gómez-Villamandos, J. C. (2007). An immunohistochemical study of the tonsils in pigs with acute African swine fever virus infection. *Research in Veterinary Science*, *83*(2), 198–203.
<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2006.11.011>
- Fernández-Pinero, J., Gallardo, C., Elizalde, M., Robles, A., Gómez, C., Bishop, R., Heath, L., Couacy-Hymann, E., Fasina, F. O., Pelayo, V., Soler, A., & Arias, M. (2013). Molecular Diagnosis of African Swine Fever by a New Real-Time PCR Using Universal Probe Library. *Transboundary and Emerging Diseases*, *60*(1), 48–58.
<https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2012.01317.x>
- Firinu, A., & Scarano. (1988). African swine fever and classical swine fever (hog cholera) among wild boar in Sardinia. *Rev Sci Tech Off Int Epizoot*, *7*, 909-915.
- Fischer, M., Hühr, J., Blome, S., Conraths, F. J., & Probst, C. (2020). Stability of African Swine Fever Virus in Carcasses of Domestic Pigs and Wild Boar Experimentally Infected with the ASFV “Estonia 2014” Isolate. *Viruses*, *12*(10), 1118. <https://doi.org/10.3390/v12101118>
- Fischer, M., Mohnke, M., Probst, C., Pikalo, J., Conraths, F. J., Beer, M., & Blome, S. (2020). Stability of African swine fever virus on heat-treated field crops. *Transboundary and Emerging Diseases*, *67*(6), 2318–2323.
<https://doi.org/10.1111/tbed.13650>
- Fishbourne, E., Abrams, C. C., Takamatsu, H.-H., & Dixon, L. K. (2013). Modulation of chemokine and chemokine receptor expression following infection of porcine macrophages with African swine fever virus. *Veterinary Microbiology*, *162*(2–4), 937–943. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.11.027>
- Forth, J. H., Amendt, J., Blome, S., Depner, K., & Kampen, H. (2018). Evaluation of blowfly larvae (Diptera: Calliphoridae) as possible reservoirs and mechanical vectors of African swine fever virus. *Transboundary and Emerging Diseases*, *65*(1), e210–e213. <https://doi.org/10.1111/tbed.12688>
- Frant, M., Lyjak, M., Bocian, L., Barszcz, A., Niemczuk, K., & Wozniakowski, G. (2020). African swine fever virus (ASFV) in Poland: Prevalence in a wild boar population (2017-2018). *Veterinárni Medicína*, *65*(4), 143–158. <https://doi.org/10.17221/105/2019-VETMED>
- Frant, M., Woźniakowski, G., & Pejsak, Z. (2017). African swine fever (ASF) and ticks. No risk of tick-mediated ASF spread in Poland and Baltic states. *Journal of Veterinary Research*, *61*(4), 375–380.
<https://doi.org/10.1515/jvetres-2017-0055>
- Franzoni, G., Dei Giudici, S., & Oggiano, A. (2018). Infection, modulation and responses of antigen-presenting cells to African swine fever viruses. *Virus Research*, *258*, 73–80.
<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2018.10.007>

- Freitas, F. B., Simões, M., Frouco, G., Martins, C., & Ferreira, F. (2019). Towards the Generation of an ASFV-pA104R DISC Mutant and a Complementary Cell Line—A Potential Methodology for the Production of a Vaccine Candidate. *Vaccines*, *7*(3), 68. <https://doi.org/10.3390/vaccines7030068>
- Frouco, G., Freitas, F. B., Coelho, J., Leitão, A., Martins, C., & Ferreira, F. (2017). DNA-Binding Properties of African Swine Fever Virus pA104R, a Histone-Like Protein Involved in Viral Replication and Transcription. *Journal of Virology*, *91*(12). <https://doi.org/10.1128/JVI.02498-16>
- Gabriel, C., Blome, S., Malogolovkin, A., Parilov, S., Kolbasov, D., Teifke, J. P., & Beer, M. (2011). Characterization of African Swine Fever Virus Caucasus Isolate in European Wild Boars. *Emerging Infectious Diseases*, *17*(12), 2342–2345. <https://doi.org/10.3201/eid1712.110430>
- Galindo, I., Cuesta-Geijo, M. A., Hlavova, K., Muñoz-Moreno, R., Barrado-Gil, L., Dominguez, J., & Alonso, C. (2015). African swine fever virus infects macrophages, the natural host cells, via clathrin- and cholesterol-dependent endocytosis. *Virus Research*, *200*, 45–55. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.01.022>
- Gallardo, C., Fernández-Pinero, J., & Arias, M. (2019). African swine fever (ASF) diagnosis, an essential tool in the epidemiological investigation. *Virus Research*, *271*, 197676. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2019.197676>
- Gallardo, C., Fernández-Pinero, J., Pelayo, V., Gazaev, I., Markowska-Daniel, I., Pridotkas, G., Nieto, R., Fernández-Pacheco, P., Bokhan, S., Nevolko, O., Drozhzhe, Z., Pérez, C., Soler, A., Kolvasov, D., & Arias, M. (2014). Genetic Variation among African Swine Fever Genotype II Viruses, Eastern and Central Europe. *Emerging Infectious Diseases*, *20*(9), 1544–1547. <https://doi.org/10.3201/eid2009.140554>
- Gallardo, C., Mwaengo, D. M., Macharia, J. M., Arias, M., Taracha, E. A., Soler, A., Okoth, E., Martín, E., Kasiti, J., & Bishop, R. P. (2009). Enhanced discrimination of African swine fever virus isolates through nucleotide sequencing of the p54, p72, and pB602L (CVR) genes. *Virus Genes*, *38*(1), 85–95. <https://doi.org/10.1007/s11262-008-0293-2>
- Gallardo, C., Nieto, R., Soler, A., Pelayo, V., Fernández-Pinero, J., Markowska-Daniel, I., Pridotkas, G., Nurmoja, I., Granta, R., Simón, A., Pérez, C., Martín, E., Fernández-Pacheco, P., & Arias, M. (2015). Assessment of African Swine Fever Diagnostic Techniques as a Response to the Epidemic Outbreaks in Eastern European Union Countries: How To Improve Surveillance and Control Programs. *Journal of Clinical Microbiology*, *53*(8), 2555–2565. <https://doi.org/10.1128/JCM.00857-15>
- Gallardo, C., Soler, A., Nieto, R., Cano, C., Pelayo, V., Sánchez, M. A., Pridotkas, G., Fernandez-Pinero, J., Briones, V., & Arias, M. (2017). Experimental Infection of Domestic Pigs with African Swine Fever Virus Lithuania 2014 Genotype II Field Isolate. *Transboundary and Emerging Diseases*, *64*(1), 300–304. <https://doi.org/10.1111/tbed.12346>
- Gallardo, C., Soler, A., Nieto, R., Carrascosa, A. L., De Mia, G. M., Bishop, R. P., Martins, C., Fasina, F. O., Couacy-Hymman, E., Heath, L., Pelayo, V., Martín, E., Simón, A., Martín, R., Okurut, A. R., Lekolol, I., Okoth, E., & Arias, M. (2013). Comparative evaluation of novel African swine fever virus (ASF) antibody detection techniques derived from specific ASF viral genotypes with the OIE internationally prescribed serological tests. *Veterinary Microbiology*, *162*(1), 32–43. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.08.011>

- Gallardo, C., Soler, A., Nieto, R., Sánchez, M. A., Martins, C., Pelayo, V., Carrascosa, A., Revilla, Y., Simón, A., Briones, V., Sánchez-Vizcaíno, J. M., & Arias, M. (2015). Experimental Transmission of African Swine Fever (ASF) Low Virulent Isolate NH/P68 by Surviving Pigs. *Transboundary and Emerging Diseases*, 62(6), 612–622. <https://doi.org/10.1111/tbed.12431>
- Gallardo, C., Soler, A., Rodze, I., Nieto, R., Cano-Gómez, C., Fernandez-Pinero, J., & Arias, M. (2019). Attenuated and non-haemadsorbing (non- <sc>HAD</sc>) genotype <sc>II</sc> African swine fever virus (<sc>ASFV</sc>) isolated in Europe, Latvia 2017. *Transboundary and Emerging Diseases*, 66(3), 1399–1404. <https://doi.org/10.1111/tbed.13132>
- Gallardo, M. C., Reoyo, A. de la T., Fernández-Pinero, J., Iglesias, I., Muñoz, M. J., & Arias, M. L. (2015). African swine fever: a global view of the current challenge. *Porcine Health Management*, 1(1), 21. <https://doi.org/10.1186/s40813-015-0013-y>
- Gao, Y., Xia, T., Bai, J., Zhang, L., Zheng, H., & Jiang, P. (2022). Preparation of Monoclonal Antibodies against the Viral p54 Protein and a Blocking ELISA for Detection of the Antibody against African Swine Fever Virus. *Viruses*, 14(11), 2335. <https://doi.org/10.3390/v14112335>
- García-Belmonte, R., Pérez-Núñez, D., Pittau, M., Richt, J. A., & Revilla, Y. (2019). African Swine Fever Virus Armenia/07 Virulent Strain Controls Interferon Beta Production through the cGAS-STING Pathway. *Journal of Virology*, 93(12). <https://doi.org/10.1128/JVI.02298-18>
- Gaudreault, N. N., Madden, D. W., Wilson, W. C., Trujillo, J. D., & Richt, J. A. (2020). African Swine Fever Virus: An Emerging DNA Arbovirus. *Frontiers in Veterinary Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00215>
- Ge, S., Liu, Y., Li, L., Wang, Q., Li, J., Ren, W., Liu, C., Bao, J., Wu, X., & Wang, Z. (2019). An extra insertion of tandem repeat sequence in African swine fever virus, China, 2019. *Virus Genes*, 55(6), 843–847. <https://doi.org/10.1007/s11262-019-01704-9>
- Geng, R., Sun, Y., Li, R., Yang, J., Ma, H., Qiao, Z., Lu, Q., Qiao, S., & Zhang, G. (2022). Development of a p72 trimer-based colloidal gold strip for detection of antibodies against African swine fever virus. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 106(7), 2703–2714. <https://doi.org/10.1007/s00253-022-11851-z>
- Gervasi, V., & Guberti, V. (2021). African swine fever endemic persistence in wild boar populations: Key mechanisms explored through modelling. *Transboundary and Emerging Diseases*, 68(5), 2812–2825. <https://doi.org/10.1111/tbed.14194>
- Gervasi, V., Marcon, A., Bellini, S., & Guberti, V. (2019). Evaluation of the Efficiency of Active and Passive Surveillance in the Detection of African Swine Fever in Wild Boar. *Veterinary Sciences*, 7(1), 5. <https://doi.org/10.3390/vetsci7010005>
- Gervasi, V., Marcon, A., & Guberti, V. (2022). Estimating the risk of environmental contamination by forest users in African Swine Fever endemic areas. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 64(1), 16. <https://doi.org/10.1186/s13028-022-00636-z>
- Giammarioli, M., Alessandro, D., Cammà, C., Masoero, L., Torresi, C., Marcacci, M., Zoppi, S., Curini, V., Rinaldi, A., Rossi, E., Casciari, C., Pela, M., Pellegrini, C., Iscaro, C., & Feliziani, F. (2023). Molecular

- Characterization of the First African Swine Fever Virus Genotype II Strains Identified from Mainland Italy, 2022. *Pathogens*, 12(3), 372. <https://doi.org/10.3390/pathogens12030372>
- Giammarioli, M., Gallardo, C., Oggiano, A., Iscaro, C., Nieto, R., Pellegrini, C., Dei Giudici, S., Arias, M., & De Mia, G. M. (2011). Genetic characterisation of African swine fever viruses from recent and historical outbreaks in Sardinia (1978–2009). *Virus Genes*, 42(3), 377–387. <https://doi.org/10.1007/s11262-011-0587-7>
- Gil, S., Sepúlveda, N., Albina, E., Leitão, A., & Martins, C. (2008). The low-virulent African swine fever virus (ASFV/NH/P68) induces enhanced expression and production of relevant regulatory cytokines (IFN α , TNF α and IL12p40) on porcine macrophages in comparison to the highly virulent ASFV/L60. *Archives of Virology*, 153(10), 1845–1854. <https://doi.org/10.1007/s00705-008-0196-5>
- Gilliaux, G., Garigliany, M., Licoppe, A., Paternostre, J., Lesenfants, C., Linden, A., & Desmecht, D. (2019). Newly emerged African swine fever virus strain Belgium/Etalle/wb/2018: Complete genomic sequence and comparative analysis with reference p72 genotype II strains. *Transboundary and Emerging Diseases*, 66(6), 2566–2591. <https://doi.org/10.1111/tbed.13302>
- Glazunova, A. A., Korennoy, F. I., Sevskikh, T. A., Lunina, D. A., Zakharova, O. I., Blokhin, A. A., Karaulov, A. K., & Gogin, A. E. (2021). Risk Factors of African Swine Fever in Domestic Pigs of the Samara Region, Russian Federation. *Frontiers in Veterinary Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.723375>
- Goatley, L. C., Reis, A. L., Portugal, R., Goldswain, H., Shimmon, G. L., Hargreaves, Z., Ho, C.-S., Montoya, M., Sánchez-Cordón, P. J., Taylor, G., Dixon, L. K., & Netherton, C. L. (2020). A Pool of Eight Virally Vectored African Swine Fever Antigens Protect Pigs against Fatal Disease. *Vaccines*, 8(2), 234. <https://doi.org/10.3390/vaccines8020234>
- Gogin, A., Gerasimov, V., Malogolovkin, A., & Kolbasov, D. (2013). African swine fever in the North Caucasus region and the Russian Federation in years 2007–2012. *Virus Research*, 173(1), 198–203. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.12.007>
- Goller, K. V., Malogolovkin, A. S., Katorkin, S., Kolbasov, D., Titov, I., Höper, D., Beer, M., Keil, G. M., Portugal, R., & Blome, S. (2015). Tandem Repeat Insertion in African Swine Fever Virus, Russia, 2012. *Emerging Infectious Diseases*, 21(4), 731–732. <https://doi.org/10.3201/eid2104.141792>
- Golnar, A. J., Martin, E., Wormington, J. D., Kading, R. C., Teel, P. D., Hamer, S. A., & Hamer, G. L. (2019). Reviewing the Potential Vectors and Hosts of African Swine Fever Virus Transmission in the United States. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 19(7), 512–524. <https://doi.org/10.1089/vbz.2018.2387>
- Gómez del Moral, M., Ortuño, E., Fernández-Zapatero, P., Alonso, F., Alonso, C., Ezquerra, A., & Domínguez, J. (1999). African Swine Fever Virus Infection Induces Tumor Necrosis Factor Alpha Production: Implications in Pathogenesis. *Journal of Virology*, 73(3), 2173–2180. <https://doi.org/10.1128/JVI.73.3.2173-2180.1999>
- Gómez-Puertas, P., Oviedo, J. M., Rodríguez, F., Coll, J., & Escribano, J. M. (1997). Neutralization Susceptibility of African Swine Fever Virus Is Dependent on the Phospholipid Composition of Viral Particles. *Virology*, 228(2), 180–189. <https://doi.org/10.1006/viro.1996.8391>

- Gómez-Puertas, P., Rodríguez, F., Oviedo, J. M., Brun, A., Alonso, C., & Escribano, J. M. (1998). 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. *Virology*, *243*(2), 461–471. <https://doi.org/10.1006/viro.1998.9068>
- Gómez-Puertas, P., Rodríguez, F., Oviedo, J. M., Ramiro-Ibáñez, F., Ruiz-Gonzalvo, F., Alonso, C., & Escribano, J. M. (1996). Neutralizing antibodies to different proteins of African swine fever virus inhibit both virus attachment and internalization. *Journal of Virology*, *70*(8), 5689–5694. <https://doi.org/10.1128/jvi.70.8.5689-5694.1996>
- Gómez-Villamandos, J. C., Bautista, M. J., Carrasco, L., Caballero, M. J., Hervás, J., Villeda, C. J., Wilkinson, P. J., & Sierra, M. A. (1997). African Swine Fever Virus Infection of Bone Marrow: Lesions and Pathogenesis. *Veterinary Pathology*, *34*(2), 97–107. <https://doi.org/10.1177/030098589703400202>
- Gómez-Villamandos, J. C., Bautista, M. J., Carrasco, L., Chacón-Manrique de Lara, F., Hervás, J., Wilkinson, P. J., & Sierra, M. A. (1998). Thrombocytopenia associated with apoptotic megakaryocytes in a viral haemorrhagic syndrome induced by a moderately virulent strain of African swine fever virus. *Journal of Comparative Pathology*, *118*(1), 1–13. [https://doi.org/10.1016/S0021-9975\(98\)80023-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9975(98)80023-6)
- Gómez-Villamandos, J. C., Bautista, M. J., Hervás, J., Carrasco, L., de Lara, F. C.-M., Pérez, J., Wilkinson, P. J., & Sierra, M. A. (1996). Subcellular changes in platelets in acute and subacute african swine fever. *Journal of Comparative Pathology*, *115*(4), 327–341. [https://doi.org/10.1016/S0021-9975\(96\)80069-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9975(96)80069-7)
- Gómez-Villamandos, J. C., Bautista, M. J., Sánchez-Cordón, P. J., & Carrasco, L. (2013). Pathology of African swine fever: The role of monocyte-macrophage. *Virus Research*, *173*(1), 140–149. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.01.017>
- Gomez-Villamandos, J. C., Hervas, J., Mendez, A., Carrasco, L., de las Mulas, J. M., Villeda, C. J., Wilkinson, P. J., & Sierra, M. A. (1995). Experimental African swine fever: apoptosis of lymphocytes and virus replication in other cells. *Journal of General Virology*, *76*(9), 2399–2405. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-76-9-2399>
- Gómez-Villamandos, J. C., Hervás, J., Méndez, A., Carrasco, L., Villeda, C. J., Wilkinson, P. J., & Sierra, M. A. (1995). A pathological study of the perisinusoidal unit of the liver in acute African swine fever. *Research in Veterinary Science*, *59*(2), 146–151. [https://doi.org/10.1016/0034-5288\(95\)90049-7](https://doi.org/10.1016/0034-5288(95)90049-7)
- Gómez-Villamandos, J. C., Hervás, J., Méndez, A., Carrasco, L., Villeda, C. J., Wilkinson, P. J., & Sierra, M. A. (1995a). Pathological changes in the renal interstitial capillaries of pigs inoculated with two different strains of african swine fever virus. *Journal of Comparative Pathology*, *112*(3), 283–298. [https://doi.org/10.1016/S0021-9975\(05\)80081-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9975(05)80081-7)
- Gómez-Villamandos, J. C., Hervás, J., Méndez, A., Carrasco, L., Villeda, C. J., Wilkinson, P. J., & Sierra, M. A. (1995b). Ultrastructural study of the renal tubular system in acute experimental African swine fever: virus replication in glomerular mesangial cells and in the collecting ducts. *Archives of Virology*, *140*(3), 581–589. <https://doi.org/10.1007/BF01718433>

- Gómez-Villamandos, J. C., Salguero, F. J., Ruiz-Villamor, E., Sánchez-Cordón, P. J., Bautista, M. J., & Sierra, M. A. (2003). Classical Swine Fever: Pathology of Bone Marrow. *Veterinary Pathology*, *40*(2), 157–163. <https://doi.org/10.1354/vp.40-2-157>
- Gómez-Villamandos JC, Carrasco L, & Bautista MJ. (2003). African swine fever and classical swine fever: a review of the pathogenesis. *DTW. Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*. 2003 Apr;*110*(4):165-169. PMID: 12756959.
- Greig, A. (1972). Pathogenesis of African swine fever in pigs naturally exposed to the disease. *Journal of Comparative Pathology*, *82*(1), 73–79. [https://doi.org/10.1016/0021-9975\(72\)90028-X](https://doi.org/10.1016/0021-9975(72)90028-X)
- Guerrasio, T., Brogi, R., Marcon, A., & Apollonio, M. (2022). Assessing the precision of wild boar density estimations. *Wildlife Society Bulletin*, *46*(4). <https://doi.org/10.1002/wsb.1335>
- Guinat, C., Gogin, A., Blome, S., Keil, G., Pollin, R., Pfeiffer, D. U., & Dixon, L. (2016). Transmission routes of African swine fever virus to domestic pigs: current knowledge and future research directions. *Veterinary Record*, *178*(11), 262–267. <https://doi.org/10.1136/vr.103593>
- Guinat, C., Reis, A. L., Netherton, C. L., Goatley, L., Pfeiffer, D. U., & Dixon, L. (2014). Dynamics of African swine fever virus shedding and excretion in domestic pigs infected by intramuscular inoculation and contact transmission. *Veterinary Research*, *45*(1), 93. <https://doi.org/10.1186/s13567-014-0093-8>
- Guinat, C., Vergne, T., Jurado-Díaz, C., Sánchez-Vizcaíno, J. M., Dixon, L., & Pfeiffer, D. U. (2017). Effectiveness and practicality of control strategies for African swine fever: what do we really know? *Veterinary Record*, *180*(4), 97–97. <https://doi.org/10.1136/vr.103992>
- Gulenkin, V. M., Korennoy, F. I., Karaulov, A. K., & Dudnikov, S. A. (2011). Cartographical analysis of African swine fever outbreaks in the territory of the Russian Federation and computer modeling of the basic reproduction ratio. *Preventive Veterinary Medicine*, *102*(3), 167–174. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2011.07.004>
- Haines, F. J., Hofmann, M. A., King, D. P., Drew, T. W., & Crooke, H. R. (2013). Development and Validation of a Multiplex, Real-Time RT PCR Assay for the Simultaneous Detection of Classical and African Swine Fever Viruses. *PLoS ONE*, *8*(7), e71019. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071019>
- Hakobyan, A., Galindo, I., Nañez, A., Arabyan, E., Karalyan, Z., Chistov, A. A., Streshnev, P. P., Korshun, V. A., Alonso, C., & Zakaryan, H. (2018). Rigid amphipathic fusion inhibitors demonstrate antiviral activity against African swine fever virus. *Journal of General Virology*, *99*(1), 148–156. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000991>
- Halasa, T., Boklund, A., Bøtner, A., Mortensen, S., & Kjær, L. J. (2019). Simulation of transmission and persistence of African swine fever in wild boar in Denmark. *Preventive Veterinary Medicine*, *167*, 68–79. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2019.03.028>
- Haresnape, J. M., Wilkinson, P. J., & Mellor, P. S. (1988). Isolation of African swine fever virus from ticks of the *Ornithodoros moubata* complex (Ixodoidea: Argasidae) collected within the African swine fever enzootic area of Malawi. *Epidemiology and Infection*, *101*(1), 173–185. <https://doi.org/10.1017/S0950268800029332>

- Hawes, P. C., Netherton, C. L., Wileman, T. E., & Monaghan, P. (2008). The Envelope of Intracellular African Swine Fever Virus Is Composed of a Single Lipid Bilayer. *Journal of Virology*, *82*(16), 7905–7912. <https://doi.org/10.1128/JVI.00194-08>
- Heath, C. M., Windsor, M., & Wileman, T. (2001). Aggresomes Resemble Sites Specialized for Virus Assembly. *The Journal of Cell Biology*, *153*(3), 449–456. <https://doi.org/10.1083/jcb.153.3.449>
- Hervás, J., Gómez-Villamandos, J. C., Méndez, A., Carrasco, L., & Sierra, M. A. (1996). The lesional changes and pathogenesis in the kidney in african swine fever. *Veterinary Research Communications*, *20*(3), 285–299. <https://doi.org/10.1007/BF00366926>
- Heuschele, W. P. (1967). Studies on the pathogenesis of african swine fever I. Quantitative studies on the sequential development of virus in pig tissues. *Archiv Für Die Gesamte Virusforschung*, *21*(3–4), 349–356. <https://doi.org/10.1007/BF01241735>
- Heuschele WP, & Coggins L. (1969). Epizootiology of African swine fever virus in warthogs. *Bull Epizoot Dis Afr. (1969)* *17*:179–83.
- Hu, Z., Tian, X., Lai, R., Wang, X., & Li, X. (2023). Current detection methods of African swine fever virus. *Frontiers in Veterinary Science*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1289676>
- Hühr, J., Schäfer, A., Schwaiger, T., Zani, L., Sehl, J., Mettenleiter, T. C., Blome, S., & Blohm, U. (2020). Impaired T-cell responses in domestic pigs and wild boar upon infection with a highly virulent African swine fever virus strain. *Transboundary and Emerging Diseases*, *67*(6), 3016–3032. <https://doi.org/10.1111/tbed.13678>
- IRUSTA, P. M., BORCA, M. V., KUTISH, G. F., LU, Z., CALER, E., CARRILLO, C., & ROCK, D. L. (1996). Amino Acid Tandem Repeats within a Late Viral Gene Define the Central Variable Region of African Swine Fever Virus. *Virology*, *220*(1), 20–27. <https://doi.org/10.1006/viro.1996.0281>
- Iscaro, C., Dondo, A., Ruocco, L., Masoero, L., Giammarioli, M., Zoppi, S., Guberti, V., & Feliziani, F. (2022). January 2022: Index case of new African Swine Fever incursion in mainland Italy. *Transboundary and Emerging Diseases*, *69*(4), 1707–1711. <https://doi.org/10.1111/tbed.14584>
- Jean-Pierre, R. P., Hagerman, A. D., & Rich, K. M. (2022). An analysis of African Swine Fever consequences on rural economies and smallholder swine producers in Haiti. *Frontiers in Veterinary Science*, *9*. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.960344>
- Jenson, J. S., Childerstone, A., Takamatsu, H.-H., Dixon, L. K., & Parkhouse, R. M. E. (2000). The cellular immune recognition of proteins expressed by an African swine fever virus random genomic library. *Journal of Immunological Methods*, *242*(1–2), 33–42. [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(00\)00222-2](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(00)00222-2)
- Jori, F., & Bastos, A. D. S. (2009). Role of Wild Suids in the Epidemiology of African Swine Fever. *EcoHealth*, *6*(2), 296–310. <https://doi.org/10.1007/s10393-009-0248-7>
- Jori, F., Vial, L., Penrith, M. L., Pérez-Sánchez, R., Etter, E., Albina, E., Michaud, V., & Roger, F. (2013). Review of the sylvatic cycle of African swine fever in sub-Saharan Africa and the Indian ocean. *Virus Research*, *173*(1), 212–227. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.10.005>

- Jouvenet, N., Monaghan, P., Way, M., & Wileman, T. (2004). Transport of African Swine Fever Virus from Assembly Sites to the Plasma Membrane Is Dependent on Microtubules and Conventional Kinesin. *Journal of Virology*, 78(15), 7990–8001. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.15.7990-8001.2004>
- Jurado, C., Fernández-Carrión, E., Mur, L., Rolesu, S., Laddomada, A., & Sánchez-Vizcaíno, J. M. (2018). Why is African swine fever still present in Sardinia? *Transboundary and Emerging Diseases*, 65(2), 557–566. <https://doi.org/10.1111/tbed.12740>
- Juszkiewicz, M., Walczak, M., Woźniakowski, G., & Podgórska, K. (2023). African Swine Fever: Transmission, Spread, and Control through Biosecurity and Disinfection, Including Polish Trends. *Viruses*, 15(11), 2275. <https://doi.org/10.3390/v15112275>
- Karalyan, Z., Avetisyan, A., Avagyan, H., Ghazaryan, H., Vardanyan, T., Manukyan, A., Semerjyan, A., & Voskanyan, H. (2019). Presence and survival of African swine fever virus in leeches. *Veterinary Microbiology*, 237, 108421. <https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2019.108421>
- Karalyan, Z., Voskanyan, H., Ter-Pogossyan, Z., Saroyan, D., & Karalova, E. (2016). IL-23/IL-17/G-CSF pathway is associated with granulocyte recruitment to the lung during African swine fever. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 179, 58–62. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2016.08.005>
- Karki, S., Moniruzzaman, M., & Aylward, F. O. (2021). Comparative Genomics and Environmental Distribution of Large dsDNA Viruses in the Family Asfarviridae. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.657471>
- Kay, S. L., Fischer, J. W., Monaghan, A. J., Beasley, J. C., Boughton, R., Campbell, T. A., Cooper, S. M., Ditchkoff, S. S., Hartley, S. B., Kilgo, J. C., Wisely, S. M., Wyckoff, A. C., VerCauteren, K. C., & Pepin, K. M. (2017). Quantifying drivers of wild pig movement across multiple spatial and temporal scales. *Movement Ecology*, 5(1), 14. <https://doi.org/10.1186/s40462-017-0105-1>
- Kim, H.-J., Cho, K.-H., Ryu, J.-H., Jang, M.-K., Chae, H.-G., Choi, J.-D., Nah, J.-J., Kim, Y.-J., & Kang, H.-E. (2020). Isolation and Genetic Characterization of African Swine Fever Virus from Domestic Pig Farms in South Korea, 2019. *Viruses*, 12(11), 1237. <https://doi.org/10.3390/v12111237>
- Kim, S., Lee, S., Jeong, H., Yoo, J., Jeong, H., Choi, Y., Son, K., & Jheong, W. (2021). Rapid emergence of African swine fever virus variants with different numbers of a tandem repeat sequence in South Korea. *Transboundary and Emerging Diseases*, 68(4), 1726–1730. <https://doi.org/10.1111/tbed.13867>
- King, D. P., Reid, S. M., Hutchings, G. H., Grierson, S. S., Wilkinson, P. J., Dixon, L. K., Bastos, A. D. S., & Drew, T. W. (2003). Development of a TaqMan® PCR assay with internal amplification control for the detection of African swine fever virus. *Journal of Virological Methods*, 107(1), 53–61. [https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(02\)00189-1](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(02)00189-1)
- King, K., Chapman, D., Argilaguet, J. M., Fishbourne, E., Hutet, E., Cariolet, R., Hutchings, G., Oura, C. A. L., Netherton, C. L., Moffat, K., Taylor, G., Le Potier, M.-F., Dixon, L. K., & Takamatsu, H.-H. (2011). Protection of European domestic pigs from virulent African isolates of African swine fever virus by experimental immunisation. *Vaccine*, 29(28), 4593–4600. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.04.052>

- Kleiboeker, S. B., Scoles, G. A., Burrage, T. G., & Sur, J.-H. (1999). African Swine Fever Virus Replication in the Midgut Epithelium Is Required for Infection of *Ornithodoros* Ticks. *Journal of Virology*, *73*(10), 8587–8598. <https://doi.org/10.1128/JVI.73.10.8587-8598.1999>
- Kolbasov, D., Titov, I., Tsybanov, S., Gogin, A., & Malogolovkin, A. (2018). African Swine Fever Virus, Siberia, Russia, 2017. *Emerging Infectious Diseases*, *24*(4), 796–798. <https://doi.org/10.3201/eid2404.171238>
- Konno, S., Taylor, W. D., Hess, W. R., & Heuschele, W. P. (1982). Spleen pathology in African swine fever. *English, Journal Article*, *62*, (No.3), *Cornell Veterinarian*, (486–506).
- Konno, S., Taylor, W., Hess WR, & Heuschele WP. (1971). Liver pathology in African swine fever. *Cornell Vet. (1971)* *61*:125–50.
- Korennoy, F. I., Gulenkin, V. M., Malone, J. B., Mores, C. N., Dudnikov, S. A., & Stevenson, M. A. (2014). Spatio-temporal modeling of the African swine fever epidemic in the Russian Federation, 2007–2012. *Spatial and Spatio-Temporal Epidemiology*, *11*, 135–141. <https://doi.org/10.1016/j.sste.2014.04.002>
- Krug, P. W., Holinka, L. G., O'Donnell, V., Reese, B., Sanford, B., Fernandez-Sainz, I., Gladue, D. P., Arzt, J., Rodriguez, L., Risatti, G. R., & Borca, M. V. (2015). The Progressive Adaptation of a Georgian Isolate of African Swine Fever Virus to Vero Cells Leads to a Gradual Attenuation of Virulence in Swine Corresponding to Major Modifications of the Viral Genome. *Journal of Virology*, *89*(4), 2324–2332. <https://doi.org/10.1128/JVI.03250-14>
- Kruszyński, M., Śródka, K., Juskiewicz, M., Siuda, D., Olszewska, M., & Woźniakowski, G. (2023). Nine Years of African Swine Fever in Poland. *Viruses*, *15*(12), 2325. <https://doi.org/10.3390/v15122325>
- Lacasta, A., Monteagudo, P. L., Jiménez-Marín, Á., Accensi, F., Ballester, M., Argilagué, J., Galindo-Cardiel, I., Segalés, J., Salas, M. L., Domínguez, J., Moreno, Á., Garrido, J. J., & Rodríguez, F. (2015). Live attenuated African swine fever viruses as ideal tools to dissect the mechanisms involved in viral pathogenesis and immune protection. *Veterinary Research*, *46*(1), 135. <https://doi.org/10.1186/s13567-015-0275-z>
- Lange, M., Siemen, H., Blome, S., & Thulke, H. H. (2014). Analysis of spatio-temporal patterns of African swine fever cases in Russian wild boar does not reveal an endemic situation. *Preventive Veterinary Medicine*, *117*(2), 317–325. <https://doi.org/10.1016/J.PREVETMED.2014.08.012>
- Lange, M., & Thulke, H.-H. (2017). Elucidating transmission parameters of African swine fever through wild boar carcasses by combining spatio-temporal notification data and agent-based modelling. *Stochastic Environmental Research and Risk Assessment*, *31*(2), 379–391. <https://doi.org/10.1007/s00477-016-1358-8>
- Leitão, A., Cartaxo, C., Coelho, R., Cruz, B., Parkhouse, R. M. E., Portugal, F. C., Vigário, J. D., & Martins, C. L. V. (2001a). The non-haemadsorbing African swine fever virus isolate ASFV/NH/P68 provides a model for defining the protective anti-virus immune response. *Journal of General Virology*, *82*(3), 513–523. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-82-3-513>
- Leitão, A., Cartaxo, C., Coelho, R., Cruz, B., Parkhouse, R. M. E., Portugal, F. C., Vigário, J. D., & Martins, C. L. V. (2001b). The non-haemadsorbing African swine fever virus isolate ASFV/NH/P68 provides a model for

- defining the protective anti-virus immune response. *Journal of General Virology*, 82(3), 513–523.
<https://doi.org/10.1099/0022-1317-82-3-513>
- Leitão, A., Malur, A., Cartaxeiro, C., Vasco, G., Cruz, B., Cornelis, P., & Martins, C. L. V. (2000). Bacterial lipoprotein based expression vectors as tools for the characterisation of African swine fever virus (ASFV) antigens. *Archives of Virology*, 145(8), 1639–1657. <https://doi.org/10.1007/s007050070081>
- Lewis, T., Zsak, L., Burrage, T. G., Lu, Z., Kutish, G. F., Neilan, J. G., & Rock, D. L. (2000). An African Swine Fever Virus *ERV1-ALR* Homologue, 9GL, Affects Virion Maturation and Viral Growth in Macrophages and Viral Virulence in Swine. *Journal of Virology*, 74(3), 1275–1285. <https://doi.org/10.1128/JVI.74.3.1275-1285.2000>
- Ley, V., Almendral, J. M., Carbonero, P., Beloso, A., Viñuela, E., & Talavera, A. (1984). Molecular cloning of African swine fever virus DNA. *Virology*, 133(2), 249–257. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(84\)90392-1](https://doi.org/10.1016/0042-6822(84)90392-1)
- Li, D., Zhang, J., Yang, W., Li, P., Ru, Y., Kang, W., Li, L., Ran, Y., & Zheng, H. (2021). African swine fever virus protein MGF-505-7R promotes virulence and pathogenesis by inhibiting JAK1- and JAK2-mediated signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 297(5), 101190. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.101190>
- Li, L., Ren, Z., Wang, Q., Ge, S., Liu, Y., Liu, C., Liu, F., Hu, Y., Li, J., Bao, J., Ren, W., Zhang, Y., Xu, T., Sun, C., Li, L., Wang, S., Fan, X., Wu, Z., Huang, B., ... Wang, Z. (2019). Infection of African swine fever in wild boar, China, 2018. *Transboundary and Emerging Diseases*, 66(3), 1395–1398.
<https://doi.org/10.1111/tbed.13114>
- Li, Y., Gao, X., An, Q., Sun, Z., & Wang, H. (2022). Ecological niche modeling based on ensemble algorithms to predicting current and future potential distribution of African swine fever virus in China. *Scientific Reports*, 12(1), 15614. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-20008-x>
- Licoppe, A., De Waele, V., Malengreaux, C., Paternostre, J., Van Goethem, A., Desmecht, D., Herman, M., & Linden, A. (2023). Management of a Focal Introduction of ASF Virus in Wild Boar: The Belgian Experience. *Pathogens*, 12(2), 152. <https://doi.org/10.3390/pathogens12020152>
- Linden, A., Licoppe, A., Volpe, R., Paternostre, J., Lesenfants, C., Cassart, D., Garigliany, M., Tignon, M., van den Berg, T., Desmecht, D., & Cay, A. B. (2019). Summer 2018: African swine fever virus hits north-western Europe. *Transboundary and Emerging Diseases*, 66(1), 54–55.
<https://doi.org/10.1111/tbed.13047>
- Liu, Y., Zhang, X., Qi, W., Yang, Y., Liu, Z., An, T., Wu, X., & Chen, J. (2021). Prevention and Control Strategies of African Swine Fever and Progress on Pig Farm Repopulation in China. *Viruses*, 13(12), 2552.
<https://doi.org/10.3390/v13122552>
- Loi, F., Cappai, S., Coccollone, A., & Rolesu, S. (2019). Standardized Risk Analysis Approach Aimed to Evaluate the Last African Swine Fever Eradication Program Performance, in Sardinia. *Frontiers in Veterinary Science*, 6. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00299>
- Lopez, E., van Heerden, J., Bosch-Camós, L., Accensi, F., Navas, M. J., López-Monteagudo, P., Argilaguet, J., Gallardo, C., Pina-Pedrero, S., Salas, M. L., Salt, J., & Rodriguez, F. (2020). Live Attenuated African Swine

- Fever Viruses as Ideal Tools to Dissect the Mechanisms Involved in Cross-Protection. *Viruses*, *12*(12), 1474. <https://doi.org/10.3390/v12121474>
- López-Otín, C., Freije, J. M. P., Parra, F., Mendez, E., & Viñuela, E. (1990). Mapping and sequence of the gene coding for protein p72, the major capsid protein of African swine fever virus. *Virology*, *175*(2), 477–484. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(90\)90432-Q](https://doi.org/10.1016/0042-6822(90)90432-Q)
- Lu, Y., Deng, X., Chen, J., Wang, J., Chen, Q., & Niu, B. (2019). Risk analysis of African swine fever in Poland based on spatio-temporal pattern and Latin hypercube sampling, 2014–2017. *BMC Veterinary Research*, *15*(1), 160. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-1903-z>
- Lv, T., Xie, X., Song, N., Zhang, S., Ding, Y., Liu, K., Diao, L., Chen, X., Jiang, S., Li, T., Zhang, W., & Cao, Y. (2022). Expounding the role of tick in African swine fever virus transmission and seeking effective prevention measures: A review. *Frontiers in Immunology*, *13*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1093599>
- Lyra T. M. (2006). La erradicación de la peste porcina africana en el Brasil, 1978-1984. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, *25*(1), 93–103.
- Mačiulskis, P., Masiulis, M., Pridotkas, G., Buitkuvienė, J., Jurgelevičius, V., Jacevičienė, I., Zagrabskaitė, R., Zani, L., & Pilevičienė, S. (2020). The African Swine Fever Epidemic in Wild Boar (*Sus scrofa*) in Lithuania (2014–2018). *Veterinary Sciences*, *7*(1), 15. <https://doi.org/10.3390/vetsci7010015>
- Malkhazova, S., Korennoy, F., Petrova, O., Gulenkin, V., & Karaulov, A. (2019). Spatio-temporal analysis of the local African swine fever epidemics in the Russian Federation, 2007–2015. *Front Vet Sci*, *10*.
- Malmquist, W. A., & Hay, D. (1960). Hemadsorption and cytopathic effect produced by African swine fever virus in swine bone marrow and buffy coat cultures. *Am. J. Vet. Res.* *21*, 104–108.
- Malogolovkin, A., Burmakina, G., Tulman, E. R., Delhon, G., Diel, D. G., Salnikov, N., Kutish, G. F., Kolbasov, D., & Rock, D. L. (2015). African swine fever virus CD2v and C-type lectin gene loci mediate serological specificity. *Journal of General Virology*, *96*(4), 866–873. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000024>
- Malogolovkin, A., & Kolbasov, D. (2019). Genetic and antigenic diversity of African swine fever virus. *Virus Research*, *271*, 197673. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2019.197673>
- Martínez-López, B., Alexandrov, T., Mur, L., Sánchez-Vizcaíno, F., & Sánchez-Vizcaíno, J. M. (2014). Evaluation of the spatial patterns and risk factors, including backyard pigs, for classical swine fever occurrence in Bulgaria using a Bayesian model. *Geospatial Health*, *8*(2), 489. <https://doi.org/10.4081/gh.2014.38>
- MARTINS, C. L. V., SCHOLL, T., MEBUS, C. A., FISCH, H., & LAWMAN, M. J. P. (1987). Modulation of Porcine Peripheral Blood-Derived Macrophage Functions by *In Vitro* Infection with African Swine Fever Virus (ASFV) Isolates of Different Virulence. *Viral Immunology*, *1*(3), 177–190. <https://doi.org/10.1089/vim.1987.1.177>
- Mazur-Panasiuk, N., & Woźniakowski, G. (2019). The unique genetic variation within the O174L gene of Polish strains of African swine fever virus facilitates tracking virus origin. *Archives of Virology*, *164*(6), 1667–1672. <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04224-x>

- Mazur-Panasiuk, N., & Woźniakowski, G. (2020). Natural inactivation of African swine fever virus in tissues: Influence of temperature and environmental conditions on virus survival. *Veterinary Microbiology*, 242, 108609. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108609>
- Mazur-Panasiuk, N., Żmudzki, J., & Woźniakowski, G. (2019). African swine fever virus – persistence in different environmental conditions and the possibility of its indirect transmission. *Journal of Veterinary Research*, 63(3), 303–310. <https://doi.org/10.2478/jvetres-2019-0058>
- McKercher, P. D., Hess, W. R., & Hamdy, F. (1978). Residual viruses in pork products. *Applied and Environmental Microbiology*, 35(1), 142–145. <https://doi.org/10.1128/aem.35.1.142-145.1978>
- Mebus, C. A., & Dardiri, A. H. (1981). *Additional characteristics of disease caused by the African swine fever viruses isolated from Brazil and the Dominican Republic.*
- Mebus, C., Arias, M., Pineda, J. M., Tapiador, J., House, C., & Sánchez-Vizcaíno, J. M. (1997). Survival of several porcine viruses in different Spanish dry-cured meat products. *Food Chemistry*, 59(4), 555–559. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(97\)00006-X](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(97)00006-X)
- MELLOR, P. S., KITCHING, R. P., & WILKINSON, P. J. (1987). Mechanical transmission of capripox virus and African swine fever virus by *Stomoxys calcitrans*. *Research in Veterinary Science*, 43(1), 109–112. [https://doi.org/10.1016/S0034-5288\(18\)30753-7](https://doi.org/10.1016/S0034-5288(18)30753-7)
- Meng, X. J., Lindsay, D. S., & Sriranganathan, N. (2009). Wild boars as sources for infectious diseases in livestock and humans. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1530), 2697–2707. <https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0086>
- Mercer, J., Schelhaas, M., & Helenius, A. (2010). Virus Entry by Endocytosis. *Annual Review of Biochemistry*, 79(1), 803–833. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060208-104626>
- Monteagudo, P. L., Lacasta, A., López, E., Bosch, L., Collado, J., Pina-Pedrero, S., Correa-Fiz, F., Accensi, F., Navas, M. J., Vidal, E., Bustos, M. J., Rodríguez, J. M., Gallei, A., Nikolín, V., Salas, M. L., & Rodríguez, F. (2017). BA71ΔCD2: a New Recombinant Live Attenuated African Swine Fever Virus with Cross-Protective Capabilities. *Journal of Virology*, 91(21). <https://doi.org/10.1128/JVI.01058-17>
- More, S., Miranda, M. A., Bicout, D., Bøtner, A., Butterworth, A., Calistri, P., Edwards, S., Garin-Bastuji, B., Good, M., Michel, V., Raj, M., Nielsen, S. S., Sihvonen, L., Spoolder, H., Stegeman, J. A., Velarde, A., Willeberg, P., Winckler, C., Depner, K., ... Gortázar Schmidt, C. (2018). African swine fever in wild boar. *EFSA Journal*, 16(7). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5344>
- Morelle, K., Jezek, M., Licoppe, A., & Podgorski, T. (2019). Deathbed choice by ASF-infected wild boar can help find carcasses. *Transboundary and Emerging Diseases*, 66(5), 1821–1826. <https://doi.org/10.1111/tbed.13267>
- Moulton, J., & Coggins, L. (1968). *Comparison of lesions in acute and chronic African swine fever.*
- Moulton JE, Pan IC, Hess WR, DeBoer CJ, & Tessler J. (1975). Pathologic features of chronic pneumonia in pigs with experimentally induced African swine fever. *Am J Vet Res.* (1975) 36:27–32.

- MOURA, J. A., MCMANUS, C. M., BERNAL, F. E. M., & DE MELO, C. B. (2010). An analysis of the 1978 African swine fever outbreak in Brazil and its eradication. *Revue Scientifique et Technique de l'OIE*, 29(3), 549–563. <https://doi.org/10.20506/rst.29.3.1992>
- Mulumba-Mfumum, L. K., Goatley, L. C., Saegerman, C., Takamatsu, H.-H., & Dixon, L. K. (2016). Immunization of African Indigenous Pigs with Attenuated Genotype I African Swine Fever Virus OURT88/3 Induces Protection Against Challenge with Virulent Strains of Genotype I. *Transboundary and Emerging Diseases*, 63(5), e323–e327. <https://doi.org/10.1111/tbed.12303>
- Mur, L., Boadella, M., Martínez-López, B., Gallardo, C., Gortazar, C., & Sánchez-Vizcaíno, J. M. (2012). Monitoring of African Swine Fever in the Wild Boar Population of the Most Recent Endemic Area of Spain. *Transboundary and Emerging Diseases*, 59(6), 526–531. <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2012.01308.x>
- Mur, L., Martínez-López, B., Costard, S., de la Torre, A., Jones, B. A., Martínez, M., Sánchez-Vizcaíno, F., Muñoz, M., Pfeiffer, D. U., Sánchez-Vizcaíno, J., & Wieland, B. (2014). Modular framework to assess the risk of African swine fever virus entry into the European Union. *BMC Veterinary Research*, 10(1), 145. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-10-145>
- Mur, L., Martínez-López, B., & Sánchez-Vizcaíno, J. (2012). Risk of African swine fever introduction into the European Union through transport-associated routes: returning trucks and waste from international ships and planes. *BMC Veterinary Research*, 8(1), 149. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-8-149>
- Murtaugh, M. P. (n.d.). *Genetic interaction between porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) strains in cell culture and in animals*.
- Netherton, C. L., Connell, S., Benfield, C. T. O., & Dixon, L. K. (2019). The Genetics of Life and Death: Virus-Host Interactions Underpinning Resistance to African Swine Fever, a Viral Hemorrhagic Disease. *Frontiers in Genetics*, 10. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00402>
- Netherton, C. L., Goatley, L. C., Reis, A. L., Portugal, R., Nash, R. H., Morgan, S. B., Gault, L., Nieto, R., Norlin, V., Gallardo, C., Ho, C.-S., Sánchez-Cordón, P. J., Taylor, G., & Dixon, L. K. (2019). Identification and Immunogenicity of African Swine Fever Virus Antigens. *Frontiers in Immunology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01318>
- Netherton, C. L., & Wileman, T. E. (2013). African swine fever virus organelle rearrangements. *Virus Research*, 173(1), 76–86. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.12.014>
- Nguyen, V. T., Cho, K., Mai, N. T. A., Park, J.-Y., Trinh, T. B. N., Jang, M.-K., Nguyen, T. T. H., Vu, X. D., Nguyen, T. L., Nguyen, V. D., Ambagala, A., Kim, Y.-J., & Le, V. P. (2022). Multiple variants of African swine fever virus circulating in Vietnam. *Archives of Virology*, 167(4), 1137–1140. <https://doi.org/10.1007/s00705-022-05363-4>
- Niederwerder, M. C., Stoian, A. M. M., Rowland, R. R. R., Dritz, S. S., Petrovan, V., Constance, L. A., Gebhardt, J. T., Olcha, M., Jones, C. K., Woodworth, J. C., Fang, Y., Liang, J., & Hefley, T. J. (2019). Infectious Dose of African Swine Fever Virus When Consumed Naturally in Liquid or Feed. *Emerging Infectious Diseases*, 25(5), 891–897. <https://doi.org/10.3201/eid2505.181495>

- Nix, R. J., Gallardo, C., Hutchings, G., Blanco, E., & Dixon, L. K. (2006). Molecular epidemiology of African swine fever virus studied by analysis of four variable genome regions. *Archives of Virology*, *151*(12), 2475–2494. <https://doi.org/10.1007/s00705-006-0794-z>
- Njau, E. P., Machuka, E. M., Cleaveland, S., Shirima, G. M., Kusiluka, L. J., Okoth, E. A., & Pelle, R. (2021). African Swine Fever Virus (ASFV): Biology, Genomics and Genotypes Circulating in Sub-Saharan Africa. *Viruses*, *13*(11), 2285. <https://doi.org/10.3390/v13112285>
- Nunes-Correia, I., Rodríguez, J. M., Eulálio, A., Carvalho, A. L., Citovsky, V., Simões, S., Faro, C., Salas, M. L., & Pedrosa de Lima, M. C. (2008). African swine fever virus p10 protein exhibits nuclear import capacity and accumulates in the nucleus during viral infection. *Veterinary Microbiology*, *130*(1–2), 47–59. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.12.010>
- Nurmoja, I., Mõtus, K., Kristian, M., Niine, T., Schulz, K., Depner, K., & Viltrop, A. (2020). Epidemiological analysis of the 2015–2017 African swine fever outbreaks in Estonia. *Preventive Veterinary Medicine*, *181*, 104556. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2018.10.001>
- Nurmoja, I., Petrov, A., Breidenstein, C., Zani, L., Forth, J. H., Beer, M., Kristian, M., Viltrop, A., & Blome, S. (2017). Biological characterization of African swine fever virus genotype II strains from north-eastern Estonia in European wild boar. *Transboundary and Emerging Diseases*, *64*(6), 2034–2041. <https://doi.org/10.1111/tbed.12614>
- Nurmoja, I., Schulz, K., Staubach, C., Sauter-Louis, C., Depner, K., Conraths, F. J., & Viltrop, A. (2017). Development of African swine fever epidemic among wild boar in Estonia - two different areas in the epidemiological focus. *Scientific Reports*, *7*(1), 12562. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12952-w>
- O'Donnell, V., Holinka, L. G., Gladue, D. P., Sanford, B., Krug, P. W., Lu, X., Arzt, J., Reese, B., Carrillo, C., Risatti, G. R., & Borca, M. V. (2015). African Swine Fever Virus Georgia Isolate Harboring Deletions of MGF360 and MGF505 Genes Is Attenuated in Swine and Confers Protection against Challenge with Virulent Parental Virus. *Journal of Virology*, *89*(11), 6048–6056. <https://doi.org/10.1128/JVI.00554-15>
- O'Donnell, V., Holinka, L. G., Sanford, B., Krug, P. W., Carlson, J., Pacheco, J. M., Reese, B., Risatti, G. R., Gladue, D. P., & Borca, M. V. (2016). African swine fever virus Georgia isolate harboring deletions of 9GL and MGF360/505 genes is highly attenuated in swine but does not confer protection against parental virus challenge. *Virus Research*, *221*, 8–14. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2016.05.014>
- O'Donnell, V., Risatti, G. R., Holinka, L. G., Krug, P. W., Carlson, J., Velazquez-Salinas, L., Azzinaro, P. A., Gladue, D. P., & Borca, M. V. (2017). Simultaneous Deletion of the 9GL and UK Genes from the African Swine Fever Virus Georgia 2007 Isolate Offers Increased Safety and Protection against Homologous Challenge. *Journal of Virology*, *91*(1). <https://doi.org/10.1128/JVI.01760-16>
- Oganesyan, A. S., Petrova, O. N., Korennoy, F. I., Bardina, N. S., Gogin, A. E., & Dudnikov, S. A. (2013). African swine fever in the Russian Federation: Spatio-temporal analysis and epidemiological overview. *Virus Research*, *173*(1), 204–211. <https://doi.org/10.1016/J.VIRUSRES.2012.12.009>
- O'Hara, K. C., Beltrán-Alcrudo, D., Hovari, M., Tabakovski, B., & Martínez-López, B. (2021). Descriptive and Multivariate Analysis of the Pig Sector in North Macedonia and Its Implications for African Swine Fever Transmission. *Frontiers in Veterinary Science*, *8*. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.733157>

- Olesen, A. S., Hansen, M. F., Rasmussen, T. B., Belsham, G. J., Bødker, R., & Bøtner, A. (2018). Survival and localization of African swine fever virus in stable flies (*Stomoxys calcitrans*) after feeding on viremic blood using a membrane feeder. *Veterinary Microbiology*, *222*, 25–29. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.06.010>
- Olesen, A. S., Lohse, L., Boklund, A., Halasa, T., Gallardo, C., Pejsak, Z., Belsham, G. J., Rasmussen, T. B., & Bøtner, A. (2017). Transmission of African swine fever virus from infected pigs by direct contact and aerosol routes. *Veterinary Microbiology*, *211*, 92–102. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.10.004>
- Olesen, A. S., Lohse, L., Hansen, M. F., Boklund, A., Halasa, T., Belsham, G. J., Rasmussen, T. B., Bøtner, A., & Bødker, R. (2018). Infection of pigs with African swine fever virus via ingestion of stable flies (*Stomoxys calcitrans*). *Transboundary and Emerging Diseases*, *65*(5), 1152–1157. <https://doi.org/10.1111/tbed.12918>
- Oļševskis, E., Guberti, V., Seržants, M., Westergaard, J., Gallardo, C., Rodze, I., & Depner, K. (2016). African swine fever virus introduction into the EU in 2014: Experience of Latvia. *Research in Veterinary Science*, *105*, 28–30. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2016.01.006>
- Oļševskis, E., Masiulis, M., Seržants, M., Lambergā, K., Šteingolde, Ž., Krivko, L., Cvetkova, S., Buitkuvienė, J., Pilevičienė, S., Zani, L., Denzin, N., & Depner, K. (2023). Do Seropositive Wild Boars Pose a Risk for the Spread of African Swine Fever? Analysis of Field Data from Latvia and Lithuania. *Pathogens*, *12*(5), 723. <https://doi.org/10.3390/pathogens12050723>
- Oļševskis, E., Schulz, K., Staubach, C., Seržants, M., Lambergā, K., Pūle, D., Ozoliņš, J., Conraths, F. J., & Sauter-Louis, C. (2020). African swine fever in Latvian wild boar—A step closer to elimination. *Transboundary and Emerging Diseases*, *67*(6), 2615–2629. <https://doi.org/10.1111/tbed.13611>
- Omelchenko, H., Avramenko, N. O., Petrenko, M. O., Wojciechowski, J., Pejsak, Z., & Woźniakowski, G. (2022). Ten Years of African Swine Fever in Ukraine: An Endemic Form of the Disease in the Wild Boar Population as a Threat to Domestic Pig Production. *Pathogens*, *11*(12), 1459. <https://doi.org/10.3390/pathogens11121459>
- O'Neill, X., White, A., Ruiz-Fons, F., & Gortázar, C. (2020). Modelling the transmission and persistence of African swine fever in wild boar in contrasting European scenarios. *Scientific Reports*, *10*(1), 5895. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62736-y>
- Onisk, D. V., Borca, M. V., Kutish, S., Kramer, E., Irusta, P., & Rock, D. L. (1994). Passively Transferred African Swine Fever Virus Antibodies Protect Swine against Lethal Infection. *Virology*, *198*(1), 350–354. <https://doi.org/10.1006/viro.1994.1040>
- Onzere, C. K., Bastos, A. D., Okoth, E. A., Lichoti, J. K., Bochere, E. N., Owido, M. G., Ndambuki, G., Bronsvort, M., & Bishop, R. P. (2018). Multi-locus sequence typing of African swine fever viruses from endemic regions of Kenya and Eastern Uganda (2011–2013) reveals rapid B602L central variable region evolution. *Virus Genes*, *54*(1), 111–123. <https://doi.org/10.1007/s11262-017-1521-4>
- Oura, C. A. L., Denyer, M. S., Takamatsu, H., & Parkhouse, R. M. E. (2005). In vivo depletion of CD8+ T lymphocytes abrogates protective immunity to African swine fever virus. *Journal of General Virology*, *86*(9), 2445–2450. <https://doi.org/10.1099/vir.0.81038-0>

- Oura, C. A., Powell, P. P., & Parkhouse, R. M. (1998). African swine fever: a disease characterized by apoptosis. *Journal of General Virology*, 79(6), 1427–1438. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-79-6-1427>
- Palgrave, C. J., Gilmour, L., Lowden, C. S., Lillico, S. G., Mellencamp, M. A., & Whitelaw, C. B. A. (2011). Species-Specific Variation in RELA Underlies Differences in NF-κB Activity: a Potential Role in African Swine Fever Pathogenesis. *Journal of Virology*, 85(12), 6008–6014. <https://doi.org/10.1128/JVI.00331-11>
- Pan, I., & Hess, W. (1984). Virulence in African swine fever: its measurement and implications. *American Journal of Veterinary Research*. 1984 Feb;45(2):361-366. PMID: 6711963.
- Parkhouse, R. M., Powell, P. P., Anderson, E., & Oura, C. A. (1998). The pathogenesis of African swine fever in the resistant bushpig. *Journal of General Virology*, 79(6), 1439–1443. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-79-6-1439>
- Pastor, M. J., Laviada, M. D., Sanchez-Vizcaino, J. M., & Escribano, J. M. (1989). Detection of African swine fever virus antibodies by immunoblotting assay. *Canadian Journal of Veterinary Research = Revue Canadienne de Recherche Veterinaire*, 53(1), 105–107.
- Pautienius, A., Grigas, J., Pileviciene, S., Zagrabaskaite, R., Buitkuviene, J., Pridotkas, G., Stankevicius, R., Streimikyte, Z., Salomskas, A., Zienius, D., & Stankevicius, A. (2018). Prevalence and spatiotemporal distribution of African swine fever in Lithuania, 2014–2017. *Virology Journal*, 15(1), 177. <https://doi.org/10.1186/s12985-018-1090-8>
- Pavone, S., Iscaro, C., Dettori, A., & Feliziani, F. (2023). African Swine Fever: The State of the Art in Italy. *Animals*, 13(19), 2998. <https://doi.org/10.3390/ani13192998>
- Pejsak, Z., Niemczuk, K., Pomorska-Mól, M., Frant, M., Ziętek-Barszcz, A., Bocian, Ł., & Woźniakowski, G. (2018). Four years of African swine fever in Poland. New insights into epidemiology and prognosis of future disease spread. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 21(4).
- Pejsak, Z., Truszczyński, M., Niemczuk, K., Kozak, E., & Markowska-Daniel, I. (2014). Epidemiology of African Swine Fever in Poland since the detection of the first case. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 17(4), 665–672. <https://doi.org/10.2478/pjvs-2014-0097>
- Penrith, M., Bastos, A. D., Etter, E. M. C., & Beltrán-Alcrudo, D. (2019). Epidemiology of African swine fever in Africa today: Sylvatic cycle versus socio-economic imperatives. *Transboundary and Emerging Diseases*, 66(2), 672–686. <https://doi.org/10.1111/tbed.13117>
- PENRITH, M. L., THOMSON, G. R., BASTOS, A. D. S., PHIRI, O. C., LUBISI, B. A., DU PLESSIS, E. C., MACOME, F., PINTO, F., BOTHA, B., & ESTERHUYSEN, J. J. (2004). An investigation into natural resistance to African swine fever in domestic pigs from an endemic area in southern Africa. *Revue Scientifique et Technique de l'OIE*, 23(3), 965–977. <https://doi.org/10.20506/rst.23.3.1533>
- Penrith, M.-L. (2009). African swine fever : transboundary diseases. *Onderstepoort J Vet Res*, 76(1). <https://doi.org/10.4102/ojvr.v76i1.70>

- Penrith, M.-L., Bastos, A., & Chenais, E. (2021). With or without a Vaccine—A Review of Complementary and Alternative Approaches to Managing African Swine Fever in Resource-Constrained Smallholder Settings. *Vaccines*, *9*(2), 116. <https://doi.org/10.3390/vaccines9020116>
- Penrith, M.-L., & Vosloo, W. (2009). Review of African swine fever : transmission, spread and control : review article. *Journal of the South African Veterinary Association*, *80*(2), 58–62. <https://doi.org/10.4102/jsava.v80i2.172>
- Penrith, M.-L., Vosloo, W., Jori, F., & Bastos, A. D. S. (2013). African swine fever virus eradication in Africa. *Virus Research*, *173*(1), 228–246. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.10.011>
- Pepin, K. M., Golnar, A. J., Abdo, Z., & Podgórski, T. (2020). Ecological drivers of African swine fever virus persistence in wild boar populations: Insight for control. *Ecology and Evolution*, *10*(6), 2846–2859. <https://doi.org/10.1002/ece3.6100>
- Pérez, J., Fernández, A., Sierra, M. A., Herráez, P., Fernández, A. I., & Martín de las Mulas, J. (1998). Serological and immunohistochemical study of African swine fever in wild boar in Spain. *Veterinary Record*, *143*(5), 136–139. <https://doi.org/10.1136/vr.143.5.136>
- Perez-Sanchez, R., Astigarraga, A., Oleaga-Perez, A., & Encinas-Grandes, A. (1994). Relationship between the persistence of African swine fever and the distribution of *Ornithodoros erraticus* in the province of Salamanca, Spain. *Veterinary Record*, *135*(9), 207–209. <https://doi.org/10.1136/vr.135.9.207>
- Petrov, A., Forth, J. H., Zani, L., Beer, M., & Blome, S. (2018). No evidence for long-term carrier status of pigs after African swine fever virus infection. *Transboundary and Emerging Diseases*, *65*(5), 1318–1328. <https://doi.org/10.1111/tbed.12881>
- Petrov, A., Schotte, U., Pietschmann, J., Dräger, C., Beer, M., Anheyer-Behmenburg, H., Goller, K. V., & Blome, S. (2014). Alternative sampling strategies for passive classical and African swine fever surveillance in wild boar. *Veterinary Microbiology*, *173*(3–4), 360–365. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.07.030>
- Phologane, S. B., Bastos, A. D. S., & Penrith, M.-L. (2005). Intra- and Inter-Genotypic Size Variation in the Central Variable Region of the 9RL Open Reading Frame of Diverse African Swine Fever Viruses. *Virus Genes*, *31*(3), 357–360. <https://doi.org/10.1007/s11262-005-3254-z>
- Pietschmann, J., Mur, L., Blome, S., Beer, M., Pérez-Sánchez, R., Oleaga, A., & Sánchez-Vizcaíno, J. M. (2016). African swine fever virus transmission cycles in Central Europe: Evaluation of wild boar-soft tick contacts through detection of antibodies against *Ornithodoros erraticus* saliva antigen. *BMC Veterinary Research*, *12*(1), 1. <https://doi.org/10.1186/s12917-015-0629-9>
- Pikalo, J., Deutschmann, P., Fischer, M., Roszyk, H., Beer, M., & Blome, S. (2021). African Swine Fever Laboratory Diagnosis—Lessons Learned from Recent Animal Trials. *Pathogens*, *10*(2), 177. <https://doi.org/10.3390/pathogens10020177>
- Pikalo, J., Schoder, M., Sehl, J., Breithaupt, A., Tignon, M., Cay, A. B., Gager, A. M., Fischer, M., Beer, M., & Blome, S. (2020). The African swine fever virus isolate Belgium 2018/1 shows high virulence in European wild boar. *Transboundary and Emerging Diseases*, *67*(4), 1654–1659. <https://doi.org/10.1111/tbed.13503>

- Pikalo, J., Zani, L., Hühr, J., Beer, M., & Blome, S. (2019). Pathogenesis of African swine fever in domestic pigs and European wild boar – Lessons learned from recent animal trials. *Virus Research*, 271, 197614. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2019.04.001>
- Pittiglio, C., Khomenko, S., & Beltran-Alcrudo, D. (2018). Wild boar mapping using population-density statistics: From polygons to high resolution raster maps. *PLOS ONE*, 13(5), e0193295. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193295>
- Plowright, W., & Parker, J. (1967). The stability of African swine fever virus with particular reference to heat and pH inactivation. *Archiv Für Die Gesamte Virusforschung*, 21(3–4), 383–402. <https://doi.org/10.1007/BF01241738>
- PLOWRIGHT, W., PARKER, J., & PEIRCE, M. A. (1969). African Swine Fever Virus in Ticks (*Ornithodoros moubata*, Murray) collected from Animal Burrows in Tanzania. *Nature*, 221(5185), 1071–1073. <https://doi.org/10.1038/2211071a0>
- Portugal, R., Goatley, L. C., Husmann, R., Zuckermann, F. A., & Dixon, L. K. (2020). A porcine macrophage cell line that supports high levels of replication of OURT88/3, an attenuated strain of African swine fever virus. *Emerging Microbes & Infections*, 9(1), 1245–1253. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1772675>
- Probst, C., Gethmann, J., Amler, S., Globig, A., Knoll, B., & Conraths, F. J. (2019). The potential role of scavengers in spreading African swine fever among wild boar. *Scientific Reports*, 9(1), 11450. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47623-5>
- Qu, H., Ge, S., Zhang, Y., Wu, X., & Wang, Z. (2022). A systematic review of genotypes and serogroups of African swine fever virus. *Virus Genes*, 58(2), 77–87. <https://doi.org/10.1007/s11262-021-01879-0>
- Quembo, C. J., Jori, F., Vosloo, W., & Heath, L. (2018). Genetic characterization of African swine fever virus isolates from soft ticks at the wildlife/domestic interface in Mozambique and identification of a novel genotype. *Transboundary and Emerging Diseases*, 65(2), 420–431. <https://doi.org/10.1111/tbed.12700>
- Rahimi, P., Sohrabi, A., Ashrafihelan, J., Edalat, R., Alamdari, M., Masoudi, M., Mostofi, S., & Azadmanesh, K. (2010). Emergence of African Swine Fever Virus, Northwestern Iran. *Emerging Infectious Diseases*, 16(12), 1946–1948. <https://doi.org/10.3201/eid1612.100378>
- Ramirez-Medina, E., Vuono, E., Rai, A., Pruitt, S., Espinoza, N., Velazquez-Salinas, L., Pina-Pedrero, S., Zhu, J., Rodriguez, F., Borca, M. V., & Gladue, D. P. (2022). Deletion of E184L, a Putative DIVA Target from the Pandemic Strain of African Swine Fever Virus, Produces a Reduction in Virulence and Protection against Virulent Challenge. *Journal of Virology*, 96(1). <https://doi.org/10.1128/JVI.01419-21>
- Ramiro-Ibanez, F., Ortega, A., Escribano, J. M., & Alonso, C. (1996). Apoptosis: a Mechanism of Cell Killing and Lymphoid Organ Impairment During Acute African Swine Fever Virus Infection. *Journal of General Virology*, 77(9), 2209–2219. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-77-9-2209>
- Ramiro-Ibáñez, F., Ortega, A., Ruiz-Gonzalvo, F., Escribano, J. M., & Alonso, C. (1997). Modulation of immune cell populations and activation markers in the pathogenesis of African swine fever virus infection. *Virus Research*, 47(1), 31–40. [https://doi.org/10.1016/S0168-1702\(96\)01403-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1702(96)01403-7)

- Ravaomanana, J., Michaud, V., Jori, F., Andriatsimahavandy, A., Roger, F., Albina, E., & Vial, L. (2010). First detection of African Swine Fever Virus in *Ornithodoros porcinus* in Madagascar and new insights into tick distribution and taxonomy. *Parasites & Vectors*, *3*(1), 115. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-3-115>
- Razzuoli, E., Franzoni, G., Carta, T., Zinellu, S., Amadori, M., Modesto, P., & Oggiano, A. (2020). Modulation of Type I Interferon System by African Swine Fever Virus. *Pathogens*, *9*(5), 361. <https://doi.org/10.3390/pathogens9050361>
- Reis, A. L., Goatley, L. C., Jabbar, T., Lopez, E., Rathakrishnan, A., & Dixon, L. K. (2020). Deletion of the Gene for the Type I Interferon Inhibitor I329L from the Attenuated African Swine Fever Virus OURT88/3 Strain Reduces Protection Induced in Pigs. *Vaccines*, *8*(2), 262. <https://doi.org/10.3390/vaccines8020262>
- Reis, A. L., Goatley, L. C., Jabbar, T., Sanchez-Cordon, P. J., Netherton, C. L., Chapman, D. A. G., & Dixon, L. K. (2017). Deletion of the African Swine Fever Virus Gene DP148R Does Not Reduce Virus Replication in Culture but Reduces Virus Virulence in Pigs and Induces High Levels of Protection against Challenge. *Journal of Virology*, *91*(24). <https://doi.org/10.1128/JVI.01428-17>
- Revilla, Y., Pérez-Núñez, D., & Richt, J. A. (2018). *African Swine Fever Virus Biology and Vaccine Approaches* (pp. 41–74). <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2017.10.002>
- Rock, D. L. (2021). Thoughts on African Swine Fever Vaccines. *Viruses*, *13*(5), 943. <https://doi.org/10.3390/v13050943>
- Rodríguez, F., Alcaraz, C., Eiras, A., Yáñez, R. J., Rodríguez, J. M., Alonso, C., Rodríguez, J. F., & Escribano, J. M. (1994). Characterization and molecular basis of heterogeneity of the African swine fever virus envelope protein p54. *Journal of Virology*, *68*(11), 7244–7252. <https://doi.org/10.1128/jvi.68.11.7244-7252.1994>
- Rodríguez, J. M., Moreno, L. T., Alejo, A., Lacasta, A., Rodríguez, F., & Salas, M. L. (2015). Genome Sequence of African Swine Fever Virus BA71, the Virulent Parental Strain of the Nonpathogenic and Tissue-Culture Adapted BA71V. *PLOS ONE*, *10*(11), e0142889. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142889>
- Rojo, G., Chamorro, M., Salas, M. L., Viñuela, E., Cuezva, J., & Salas, J. (1998). Migration of Mitochondria to Viral Assembly Sites in African Swine Fever Virus-Infected Cells. *Journal of Virology*, *72*(9), 7583–7588. <https://doi.org/10.1128/JVI.72.9.7583-7588.1998>
- Rolesu, S., Mandas, D., Loi, F., Oggiano, A., Dei Giudici, S., Franzoni, G., Guberti, V., & Cappai, S. (2021). African Swine Fever in Smallholder Sardinian Farms: Last 10 Years of Network Transmission Reconstruction and Analysis. *Frontiers in Veterinary Science*, *8*. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.692448>
- Rowlands, R. J., Duarte, M. M., Boinas, F., Hutchings, G., & Dixon, L. K. (2009). The CD2v protein enhances African swine fever virus replication in the tick vector, *Ornithodoros erraticus*. *Virology*, *393*(2), 319–328. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.07.040>
- Rowlands, R. J., Michaud, V., Heath, L., Hutchings, G., Oura, C., Vosloo, W., Dwarka, R., Onashvili, T., Albina, E., & Dixon, L. K. (2008). African Swine Fever Virus Isolate, Georgia, 2007. *Emerging Infectious Diseases*, *14*(12), 1870–1874. <https://doi.org/10.3201/eid1412.080591>

- Ruedas-Torres, I., Rodríguez-Gómez, I. M., Sánchez-Carvajal, J. M., Larenas-Muñoz, F., Pallarés, F. J., Carrasco, L., & Gómez-Laguna, J. (2021). The jigsaw of PRRSV virulence. *Veterinary Microbiology*, *260*, 109168. <https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2021.109168>
- RUIZ-GONZALVO, F., RODRÍGUEZ, F., & ESCRIBANO, J. M. (1996). Functional and Immunological Properties of the Baculovirus-Expressed Hemagglutinin of African Swine Fever Virus. *Virology*, *218*(1), 285–289. <https://doi.org/10.1006/viro.1996.0193>
- Ryser-Degiorgis, M. P. (2013). Wildlife health investigations: needs, challenges and recommendations. . *BMC Veterinary Research*, *9*, 1-17.
- Ryser-Degiorgis, M., Pewsner, M., & Angst, C. (2015). Joining the dots – understanding the complex interplay between the values we place on wildlife, biodiversity conservation, human and animal health: A review. *Schweiz Arch Tierheilkd*, *157*(5), 243–253. <https://doi.org/10.17236/sat00018>
- Salas, M. L., & Andrés, G. (2013). African swine fever virus morphogenesis. *Virus Research*, *173*(1), 29–41. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.09.016>
- Salguero, F. J. (2020). Comparative Pathology and Pathogenesis of African Swine Fever Infection in Swine. *Frontiers in Veterinary Science*, *7*. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00282>
- Salguero, F. J., Gil, S., Revilla, Y., Gallardo, C., Arias, M., & Martins, C. (2008). Cytokine mRNA expression and pathological findings in pigs inoculated with African swine fever virus (E-70) deleted on A238L. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *124*(1–2), 107–119. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.02.012>
- Salguero, F. J., Ruiz-Villamor, E., Bautista, M. J., Sánchez-Cordón, P. J., Carrasco, L., & Gómez-Villamandos, J. C. (2002). Changes in macrophages in spleen and lymph nodes during acute African swine fever: expression of cytokines. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *90*(1–2), 11–22. [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(02\)00225-8](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(02)00225-8)
- Salguero, F. J., Sánchez-Cordón, P. J., Núñez, A., Fernández de Marco, M., & Gómez-Villamandos, J. C. (2005). Proinflammatory Cytokines Induce Lymphocyte Apoptosis in Acute African Swine Fever Infection. *Journal of Comparative Pathology*, *132*(4), 289–302. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2004.11.004>
- Salguero, F. J., Sánchez-Cordón, P. J., Sierra, M. A., Jover, A., Núñez, A., & Gómez-Villamandos, J. C. (2004). Apoptosis of thymocytes in experimental African swine fever virus infection. *Centro de Investigación En Sanidad Animal (CISA)*.
- Sánchez, E. G., Pérez-Núñez, D., & Revilla, Y. (2019). Development of vaccines against African swine fever virus. *Virus Research*, *265*, 150–155. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2019.03.022>
- Sanchez-Botija C. (1982). African swine fever. New developments. . *Rev Sci Tech*. (1982) *4*:1065–94.
- Sánchez-Cordón, Nunez, Neimanis, Wikström-Lassa, Montoya, Crooke, & Gavier-Widén. (2019). African Swine Fever: Disease Dynamics in Wild Boar Experimentally Infected with ASFV Isolates Belonging to Genotype I and II. *Viruses*, *11*(9), 852. <https://doi.org/10.3390/v11090852>

- Sánchez-Cordón, P. J., Chapman, D., Jabbar, T., Reis, A. L., Goatley, L., Netherton, C. L., Taylor, G., Montoya, M., & Dixon, L. (2017). Different routes and doses influence protection in pigs immunised with the naturally attenuated African swine fever virus isolate OURT88/3. *Antiviral Research*, *138*, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2016.11.021>
- Sánchez-Cordón, P. J., Jabbar, T., Chapman, D., Dixon, L. K., & Montoya, M. (2020). Absence of Long-Term Protection in Domestic Pigs Immunized with Attenuated African Swine Fever Virus Isolate OURT88/3 or BeninΔMGF Correlates with Increased Levels of Regulatory T Cells and Interleukin-10. *Journal of Virology*, *94*(14). <https://doi.org/10.1128/JVI.00350-20>
- Sánchez-Cordón, P. J., Montoya, M., Reis, A. L., & Dixon, L. K. (2018). African swine fever: A re-emerging viral disease threatening the global pig industry. *The Veterinary Journal*, *233*, 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2017.12.025>
- Sánchez-Cordón, P. J., Romero-Trevejo, J. L., Pedrera, M., Sánchez-Vizcaíno, J. M., Bautista, M. J., & Gómez-Villamandos, J. C. (2008). Role of hepatic macrophages during the viral haemorrhagic fever induced by African swine fever virus. *Histology and histopathology*.
- Sanchez-Vizcaino, J. M. (1987). *African Swine Fever Diagnosis* (pp. 63–71). https://doi.org/10.1007/978-1-4613-2343-3_7
- Sánchez-Vizcaíno, J. M., Martínez-López, B., Martínez-Avilés, M., Martins, C., Boinas, F., Vialc, L., Michaud, V., Jori, F., Etter, E., Albina, E., & Roger, F. (2009). Scientific review on African Swine Fever. *EFSA Supporting Publications*, *6*(8). <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2009.EN-5>
- Sánchez-Vizcaíno, J. M., Mur, L., Gomez-Villamandos, J. C., & Carrasco, L. (2015). An Update on the Epidemiology and Pathology of African Swine Fever. *Journal of Comparative Pathology*, *152*(1), 9–21. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2014.09.003>
- Sánchez-Vizcaíno, J. M., Mur, L., & Martínez-López, B. (2013). African swine fever (ASF): Five years around Europe. *Veterinary Microbiology*, *165*(1–2), 45–50. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.11.030>
- Sanchez-Vizcaino JM, Slauson DO, Ruiz-Gonzalvo F, & Valero F. (1981). Lymphocyte function and cell-mediated immunity in pigs with experimentally induced African swine fever. *Am J Vet Res*. (1981) *42*:1335–41.
- Sanford, B., Holinka, L. G., O'Donnell, V., Krug, P. W., Carlson, J., Alfano, M., Carrillo, C., Wu, P., Lowe, A., Risatti, G. R., Gladue, D. P., & Borca, M. V. (2016). Deletion of the thymidine kinase gene induces complete attenuation of the Georgia isolate of African swine fever virus. *Virus Research*, *213*, 165–171. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.12.002>
- Sang, H., Miller, G., Lokhandwala, S., Sangewar, N., Waghela, S. D., Bishop, R. P., & Mwangi, W. (2020). Progress Toward Development of Effective and Safe African Swine Fever Virus Vaccines. *Frontiers in Veterinary Science*, *7*. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00084>
- Sanna, G., Dei Giudici, S., Bacciu, D., Angioi, P. P., Giammarioli, M., De Mia, G. M., & Oggiano, A. (2017). Improved Strategy for Molecular Characterization of African Swine Fever Viruses from Sardinia, Based

- on Analysis of p30, CD2V and I73R / I329L Variable Regions. *Transboundary and Emerging Diseases*, 64(4), 1280–1286. <https://doi.org/10.1111/tbed.12504>
- Sauter-Louis, C., Conraths, F. J., Probst, C., Blohm, U., Schulz, K., Sehl, J., Fischer, M., Forth, J. H., Zani, L., Depner, K., Mettenleiter, T. C., Beer, M., & Blome, S. (2021). African Swine Fever in Wild Boar in Europe—A Review. *Viruses*, 13(9), 1717. <https://doi.org/10.3390/v13091717>
- Schäfer, A., Hühr, J., Schwaiger, T., Dorhoi, A., Mettenleiter, T. C., Blome, S., Schröder, C., & Blohm, U. (2019). Porcine Invariant Natural Killer T Cells: Functional Profiling and Dynamics in Steady State and Viral Infections. *Frontiers in Immunology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01380>
- Schäfer, A., Zani, L., Pikalo, J., Hühr, J., Sehl, J., Mettenleiter, T. C., Breithaupt, A., Blome, S., & Blohm, U. (2021). T-cell responses in domestic pigs and wild boar upon infection with the moderately virulent African swine fever virus strain ‘Estonia2014.’ *Transboundary and Emerging Diseases*, 68(5), 2733–2749. <https://doi.org/10.1111/tbed.14048>
- Schlafer, D. H., McVicar, J. W., & Mebus, C. A. (1984). African swine fever convalescent sows: subsequent pregnancy and the effect of colostrum antibody on challenge inoculation of their pigs. *American Journal of Veterinary Research* Volume 45, Issue 7, Jul 1984, Pages 1361-1366.
- Schulz, K., Conraths, F. J., Blome, S., Staubach, C., & Sauter-Louis, C. (2019). African Swine Fever: Fast and Furious or Slow and Steady? *Viruses*, 11(9), 866. <https://doi.org/10.3390/v11090866>
- Schulz, K., Conraths, F. J., Staubach, C., Viltrop, A., Oļševskis, E., Nurmoja, I., Lamberg, K., & Sauter-Louis, C. (2020). To sample or not to sample? Detection of African swine fever in wild boar killed in road traffic accidents. *Transboundary and Emerging Diseases*, 67(5), 1816–1819. <https://doi.org/10.1111/tbed.13560>
- Schulz, K., Masiulis, M., Staubach, C., Malakauskas, A., Pridotkas, G., Conraths, F. J., & Sauter-Louis, C. (2021). African Swine Fever and Its Epidemiological Course in Lithuanian Wild Boar. *Viruses*, 13(7), 1276. <https://doi.org/10.3390/v13071276>
- Schulz, K., Oļševskis, E., Staubach, C., Lamberg, K., Seržants, M., Cvetkova, S., Conraths, F. J., & Sauter-Louis, C. (2019). Epidemiological evaluation of Latvian control measures for African swine fever in wild boar on the basis of surveillance data. *Scientific Reports*, 9(1), 4189. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40962-3>
- Schulz, K., Schulz, J., Staubach, C., Blome, S., Nurmoja, I., Conraths, F. J., Sauter-Louis, C., & Viltrop, A. (2021). African Swine Fever Re-Emerging in Estonia: The Role of Seropositive Wild Boar from an Epidemiological Perspective. *Viruses*, 13(11), 2121. <https://doi.org/10.3390/v13112121>
- Schulz, K., Staubach, C., Blome, S., Nurmoja, I., Viltrop, A., Conraths, F. J., Kristian, M., & Sauter-Louis, C. (2020). How to Demonstrate Freedom from African Swine Fever in Wild Boar—Estonia as an Example. *Vaccines*, 8(2), 336. <https://doi.org/10.3390/vaccines8020336>
- Schulz, K., Staubach, C., Blome, S., Viltrop, A., Nurmoja, I., Conraths, F. J., & Sauter-Louis, C. (2019). Analysis of Estonian surveillance in wild boar suggests a decline in the incidence of African swine fever. *Scientific Reports*, 9(1), 8490. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44890-0>

- Scientific Opinion on African Swine Fever. (2010). *EFSA Journal*, 8(3).
<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1556>
- Scientific Opinion on African swine fever. (2014). *EFSA Journal*, 12(4).
<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2014.3628>
- Sehl, J., Pikalo, J., Schäfer, A., Franzke, K., Pannhorst, K., Elnagar, A., Blohm, U., Blome, S., & Breithaupt, A. (2020). Comparative Pathology of Domestic Pigs and Wild Boar Infected with the Moderately Virulent African Swine Fever Virus Strain “Estonia 2014.” *Pathogens*, 9(8), 662.
<https://doi.org/10.3390/pathogens9080662>
- Seifert H. S. H. (1996). *Tropical animal health (eds Technical Centre for Agriculture and Rural Cooperation). Ede, The Netherlands: Springer.*
- Servizio Sanitario Regionale Emilia Romagna. (2024). *Peste suina africana, confermato un caso in un cinghiale selvatico trovato morto nel comune di Tornolo.*
- Shimmon, G. L., Hui, J. Y. K., Wileman, T. E., & Netherton, C. L. (2021). Autophagy impairment by African swine fever virus. *Journal of General Virology*, 102(8). <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001637>
- Sierra, M. A., Bernabe, A., Mozos, E., Mendez, A., & Jover, A. (1987). Ultrastructure of the Liver in Pigs with Experimental African Swine Fever. *Veterinary Pathology*, 24(5), 460–462.
<https://doi.org/10.1177/030098588702400516>
- Sierra, M. A., Carrasco, L., Gómez-Villamandos, J. C., Martín de las Mulas, J., Méndez, A., & Jover, A. (1990). Pulmonary intravascular macrophages in lungs of pigs inoculated with african swine fever virus of differing virulence. *Journal of Comparative Pathology*, 102(3), 323–334. [https://doi.org/10.1016/S0021-9975\(08\)80021-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9975(08)80021-7)
- Sierra, M. A., Quezada, M., Fernandez, A., Carrasco, L., Gomez-Villamandos, J. C., de Las Mulas, J. M., & Sanchez-Vizcaino, J. M. (1989). Experimental African Swine Fever: Evidence of the Virus in Interstitial Tissues of the Kidney. *Veterinary Pathology*, 26(2), 173–176.
<https://doi.org/10.1177/030098588902600211>
- Simões, M., Freitas, F. B., Leitão, A., Martins, C., & Ferreira, F. (2019). African swine fever virus replication events and cell nucleus: New insights and perspectives. *Virus Research*, 270, 197667.
<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2019.197667>
- Simulundu, E., Lubaba, C., van Heerden, J., Kajihara, M., Mataa, L., Chambaro, H., Sinkala, Y., Munjita, S., Munang’andu, H., Nalubamba, K., Samui, K., Pandey, G., Takada, A., & Mweene, A. (2017). The Epidemiology of African Swine Fever in “Nonendemic” Regions of Zambia (1989–2015): Implications for Disease Prevention and Control. *Viruses*, 9(9), 236. <https://doi.org/10.3390/v9090236>
- Sindryakova, I. P., Morgunov, Yu. P., Chichikin, A. Yu., Gazaev, I. Kh., Kudryashov, D. A., & Tsybanov, S. Zh. (2016). THE INFLUENCE OF TEMPERATURE ON THE RUSSIAN ISOLATE OF AFRICAN SWINE FEVER VIRUS IN PORK PRODUCTS AND FEED WITH EXTRAPOLATION TO NATURAL CONDITIONS. *Sel’skokhozyaistvennaya Biologiya*, 51(4), 467–474.
<https://doi.org/10.15389/agrobiology.2016.4.467eng>

- Śmietanka, K., Woźniakowski, G., Kozak, E., Niemczuk, K., Frączyk, M., Bocian, Ł., Kowalczyk, A., & Pejsak, Z. (2016). African Swine Fever Epidemic, Poland, 2014–2015. *Emerging Infectious Diseases*, 22(7), 1201–1207. <https://doi.org/10.3201/eid2207.151708>
- Smither, S. J., Nelson, M., Eastaugh, L., Laws, T. R., Taylor, C., Smith, S. A., Salguero, F. J., & Lever, M. S. (2013). Experimental respiratory *M* arburg virus haemorrhagic fever infection in the common marmoset (*C* allithrix jacchus). *International Journal of Experimental Pathology*, 94(2), 156–168. <https://doi.org/10.1111/iep.12018>
- Smither, S. J., Nelson, M., Eastaugh, L., Nunez, A., Salguero, F. J., & Lever, M. S. (2015). Experimental Respiratory Infection of Marmosets (*Callithrix jacchus*) With Ebola Virus Kikwit. *Journal of Infectious Diseases*, 212(suppl 2), S336–S345. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiv371>
- Song, J., Li, K., Li, T., Zhao, G., Zhou, S., Li, H., Li, J., & Weng, C. (2020). Screening of PRRSV- and ASFV-encoded proteins involved in the inflammatory response using a porcine iGLuc reporter. *Journal of Virological Methods*, 285, 113958. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2020.113958>
- Ståhl, K., Boklund, A., Podgórski, T., Vergne, T., Abrahantes, J. C., Papanikolaou, A., Zancanaro, G., & Mur, L. (2023). Epidemiological analysis of African swine fever in the European Union during 2022. *EFSA Journal*, 21(5). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2023.8016>
- Ståhl, K., Sternberg-Lewerin, S., Blome, S., Viltrop, A., Penrith, M.-L., & Chenais, E. (2019). Lack of evidence for long term carriers of African swine fever virus - a systematic review. *Virus Research*, 272, 197725. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2019.197725>
- State Veterinary Administration. (2023). *African Swine Fever in the Czech Republic*.
- Stoian, A. M. M., Zimmerman, J., Ji, J., Hefley, T. J., Dee, S., Diel, D. G., Rowland, R. R. R., & Niederwerder, M. C. (2019). Half-Life of African Swine Fever Virus in Shipped Feed. *Emerging Infectious Diseases*, 25(12), 2261–2263. <https://doi.org/10.3201/eid2512.191002>
- Sumption, K. J., Hutchings, G. H., Wilkinson, P. J., & Dixon, L. K. (1990). Variable regions on the genome of Malawi isolates of African swine fever virus. *Journal of General Virology*, 71(10), 2331–2340. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-71-10-2331>
- Tabarés, E., Marcotegui, M. A., Fernández, M., & Sánchez-Botija, C. (1980). Proteins specified by African swine fever virus. *Archives of Virology*, 66(2), 107–117. <https://doi.org/10.1007/BF01314979>
- Takamatsu, H.-H., Denyer, M. S., Lacasta, A., Stirling, C. M. A., Argilagué, J. M., Netherton, C. L., Oura, C. A. L., Martins, C., & Rodríguez, F. (2013). Cellular immunity in ASFV responses. *Virus Research*, 173(1), 110–121. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.11.009>
- Teklué, T., Sun, Y., Abid, M., Luo, Y., & Qiu, H. (2020). Current status and evolving approaches to African swine fever vaccine development. *Transboundary and Emerging Diseases*, 67(2), 529–542. <https://doi.org/10.1111/tbed.13364>
- Terpstra, C., & Wensvoort, G. (1986). *African swine fever in Netherlands, Tijdschrift voor diergeneeskunde*.

- Thanapongtharm, W., Wongphruksasoong, V., Sangrat, W., Thongsrimoung, K., Ratanavanichrojn, N., Kasemsuwan, S., Khamsiriwatchara, A., Kaewkungwal, J., & Leelahapongsathon, K. (2022). Application of Spatial Risk Assessment Integrated With a Mobile App in Fighting Against the Introduction of African Swine Fever in Pig Farms in Thailand: Development Study. *JMIR Formative Research*, 6(5), e34279. <https://doi.org/10.2196/34279>
- Thanh, T. H. T., Duc, T. A., Viet, L. D., Van, H. T., Thi, N. C., Thi, C. N., Thi, N. H., & Vu, D. H. (2021). Rapid Identification for Serotyping of African Swine Fever Virus Based on the Short Fragment of the EP402R Gene Encoding for CD2-Like Protein. *Acta Veterinaria*, 71(1), 98–106. <https://doi.org/10.2478/acve-2021-0007>
- Thomson, G. R., Gainaru, M. D., & Van Dellen, A. F. (1980). Experimental infection of warthog (*Phacochoerus aethiopicus*) with African swine fever virus. *Onderstepoort J Vet Res* (1980) 47:19–22.
- Thomson GR. (1985). The epidemiology of African swine fever: the role of free-living hosts in Africa. . *Onderstepoort J Vet Res*. (1985) 52:201–9.
- Tignon, M., Gallardo, C., Iscaro, C., Hutet, E., Van der Stede, Y., Kolbasov, D., De Mia, G. M., Le Potier, M.-F., Bishop, R. P., Arias, M., & Koenen, F. (2011). Development and inter-laboratory validation study of an improved new real-time PCR assay with internal control for detection and laboratory diagnosis of African swine fever virus. *Journal of Virological Methods*, 178(1–2), 161–170. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.09.007>
- Tiwari, S., Dhakal, T., Kim, T.-S., Lee, D.-H., Jang, G.-S., & Oh, Y. (2022). Climate Change Influences the Spread of African Swine Fever Virus. *Veterinary Sciences*, 9(11), 606. <https://doi.org/10.3390/vetsci9110606>
- Tran, X. H., Le, T. T. P., Nguyen, Q. H., Do, T. T., Nguyen, V. D., Gay, C. G., Borca, M. V., & Gladue, D. P. (2022). African swine fever virus vaccine candidate ASFV-G- Δ I177L efficiently protects European and native pig breeds against circulating Vietnamese field strain. *Transboundary and Emerging Diseases*, 69(4). <https://doi.org/10.1111/tbed.14329>
- Tran, X. H., Phuong, L. T. T., Huy, N. Q., Thuy, D. T., Nguyen, V. D., Quang, P. H., Ngõn, Q. V., Rai, A., Gay, C. G., Gladue, D. P., & Borca, M. V. (2022). Evaluation of the Safety Profile of the ASFV Vaccine Candidate ASFV-G-ΔI177L. *Viruses*, 14(5), 896. <https://doi.org/10.3390/v14050896>
- Turčinavičienė, J., Petrašiūnas, A., Bernotienė, R., Masiulis, M., & Jonušaitis, V. (2021). The contribution of insects to African swine fever virus dispersal: data from domestic pig farms in Lithuania. *Medical and Veterinary Entomology*, 35(3), 484–489. <https://doi.org/10.1111/mve.12499>
- Turlewicz-Podbielska, H., Kuriga, A., Niemyjski, R., Tarasiuk, G., & Pomorska-Mól, M. (2021). African Swine Fever Virus as a Difficult Opponent in the Fight for a Vaccine—Current Data. *Viruses*, 13(7), 1212. <https://doi.org/10.3390/v13071212>
- Ungur, A., Cazan, C. D., Panait, L. C., Taulescu, M., Balmoş, O. M., Mihaiu, M., Bărbuceanu, F., Mihalca, A. D., & Cătoi, C. (2021). Genotyping of African Swine Fever Virus (ASFV) Isolates in Romania with the First Report of Genotype II in Symptomatic Pigs. *Veterinary Sciences*, 8(12), 290. <https://doi.org/10.3390/vetsci8120290>

- Ungur, A., Cazan, C. D., Panait, L.-C., Coroian, M., & Cătoi, C. (2022). What Is the Real Influence of Climatic and Environmental Factors in the Outbreaks of African Swine Fever? *Animals*, *12*(6), 781. <https://doi.org/10.3390/ani12060781>
- Urbano, A. C., & Ferreira, F. (2022). African swine fever control and prevention: an update on vaccine development. *Emerging Microbes & Infections*, *11*(1), 2021–2033. <https://doi.org/10.1080/22221751.2022.2108342>
- Vallée, I., Tait, S. W. G., & Powell, P. P. (2001). African Swine Fever Virus Infection of Porcine Aortic Endothelial Cells Leads to Inhibition of Inflammatory Responses, Activation of the Thrombotic State, and Apoptosis. *Journal of Virology*, *75*(21), 10372–10382. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.21.10372-10382.2001>
- Valstybinė maistui veterinarijos tarnyba. (2023). *State Food And Veterinary Service African Swine Fever in Lithuania*.
- van Boxel-Dezaire, A. H., Rani, M. S., & Stark, G. R. (2006). Complex modulation of cell type-specific signaling in response to type I interferons. *Immunity*, *25*(3), 361–372.
- Van Schepen, M. D., & Kunesch, J. P. (1981). African Swine Fever: An Overview. . *Iowa State Veterinarian* *1981*, *43*, 100–107.
- Velazquez-Salinas, L., Ramirez-Medina, E., Rai, A., Pruitt, S., Vuono, E. A., Espinoza, N., Gladue, D. P., & Borca, M. V. (2021). Development Real-Time PCR Assays to Genetically Differentiate Vaccinated Pigs From Infected Pigs With the Eurasian Strain of African Swine Fever Virus. *Frontiers in Veterinary Science*, *8*. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.768869>
- Vilem, A., Nurmoja, I., Niine, T., Riit, T., Nieto, R., Viltrop, A., & Gallardo, C. (2020). Molecular Characterization of African Swine Fever Virus Isolates in Estonia in 2014–2019. *Pathogens*, *9*(7), 582. <https://doi.org/10.3390/pathogens9070582>
- Vilem, A., Nurmoja, I., Tummeleht, L., & Viltrop, A. (2023). Differentiation of African Swine Fever Virus Strains Isolated in Estonia by Multiple Genetic Markers. *Pathogens*, *12*(5), 720. <https://doi.org/10.3390/pathogens12050720>
- Villeda, C. J., Williams, S. M., Wilkinson, P. J., & Viqueira, E. (1993a). Consumption coagulopathy associated with shock in acute African swine fever. *Archives of Virology*, *133*(3–4), 467–475. <https://doi.org/10.1007/BF01313784>
- Villeda, C. J., Williams, S. M., Wilkinson, P. J., & Viqueira, E. (1993b). Haemostatic abnormalities in African swine fever/A comparison of two virus strains of different virulence (Dominican Republic '78 and Malta '78). *Archives of Virology*, *130*(1–2), 71–83. <https://doi.org/10.1007/BF01318997>
- Vlasova, N., Varentsova, A., Shevchenko, I., Zhukov, I., Remyga, S., Gavrilo, V., Puzankova, O., Shevtsov, A., Zinyakov, N., & Gruzdev, K. (2015). Comparative Analysis of Clinical and Biological Characteristics of African Swine Fever Virus Isolates from 2013 Year Russian Federation. *British Microbiology Research Journal*, *5*(3), 203–215. <https://doi.org/10.9734/BMRJ/2015/12941>

- Walczak, M., Frant, M., Juszkiewicz, M., Mazur-Panasiuk, N., Szymankiewicz, K., Bruczyńska, M., & Woźniakowski, G. (2020). Vertical transmission of anti-ASFV antibodies as one of potential causes of seropositive results among young wild boar population in Poland. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 21-25.
- Walczak, M., Juszkiewicz, M., Szymankiewicz, K., Szczotka-Bochniarz, A., & Woźniakowski, G. (2022). ASF - survivors' sera do not inhibit African swine fever virus replication *in vitro*. *Journal of Veterinary Research*, 66(1), 21–27. <https://doi.org/10.2478/jvetres-2022-0016>
- Wang, Q., Chang, B. J., & Riley, T. V. (2010). Erysipelothrix rhusiopathiae. *Veterinary Microbiology*, 140(3–4), 405–417. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.08.012>
- Wang, T., Luo, R., Sun, Y., & Qiu, H.-J. (2021). Current efforts towards safe and effective live attenuated vaccines against African swine fever: challenges and prospects. *Infectious Diseases of Poverty*, 10(1), 137. <https://doi.org/10.1186/s40249-021-00920-6>
- Wang, T., Sun, Y., Huang, S., & Qiu, H.-J. (2020). Multifaceted Immune Responses to African Swine Fever Virus: Implications for Vaccine Development. *Veterinary Microbiology*, 249, 108832. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108832>
- Wang, T., Wang, L., Han, Y., Pan, L., Yang, J., Sun, M., Zhou, P., Sun, Y., Bi, Y., & Qiu, H. (2021). Adaptation of African swine fever virus to HEK293T cells. *Transboundary and Emerging Diseases*, 68(5), 2853–2866. <https://doi.org/10.1111/tbed.14242>
- Wang, Y., Kang, W., Yang, W., Zhang, J., Li, D., & Zheng, H. (2021). Structure of African Swine Fever Virus and Associated Molecular Mechanisms Underlying Infection and Immunosuppression: A Review. *Frontiers in Immunology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.715582>
- Wang, Y., Wang, B., Xu, D., Zhang, M., Zhang, X., & Wang, D. (2022). Development of a ladder-shape melting temperature isothermal amplification (LMTIA) assay for detection of African swine fever virus (ASFV). *Journal of Veterinary Science*, 23(4). <https://doi.org/10.4142/jvs.22001>
- Wilkinson, P. J. (1984). The persistence of African swine fever in Africa and the Mediterranean. *Preventive Veterinary Medicine*, 2(1–4), 71–82. [https://doi.org/10.1016/0167-5877\(84\)90050-3](https://doi.org/10.1016/0167-5877(84)90050-3)
- Wilkinson, P. J., Donaldson, A. I., Greig, A., & Bruce, W. (1977). Transmission studies with African swine fever virus. *Journal of Comparative Pathology*, 87(3), 487–495. [https://doi.org/10.1016/0021-9975\(77\)90037-8](https://doi.org/10.1016/0021-9975(77)90037-8)
- Wilkinson, P. J., Pegram, R. G., Perry, B. D., Lemche, J., & Schels, H. F. (1988). The distribution of African swine fever virus isolated from *Ornithodoros moubata* in Zambia. *Epidemiology and Infection*, 101(3), 547–564. <https://doi.org/10.1017/S0950268800029423>
- WOAH. (2015). *Expert mission on African swine fever in Belarus* .
- WOAH. (2021). *WOAH - Terrestrial manual online access*.
- WOAH. (2024a). *Situation report period covered – 29 January 2024– 18 February 2024*.
- WOAH. (2024b). *Situation reports for African swine fever (ASF)* .

- Woźniakowski, G., Kozak, E., Kowalczyk, A., Łyjak, M., Pomorska-Mól, M., Niemczuk, K., & Pejsak, Z. (2016). Current status of African swine fever virus in a population of wild boar in eastern Poland (2014–2015). *Archives of Virology*, *161*(1), 189–195. <https://doi.org/10.1007/s00705-015-2650-5>
- Woźniakowski, G., Pejsak, Z., & Jabłoński, A. (2021). Emergence of African Swine Fever in Poland (2014–2021). Successes and Failures in Disease Eradication. *Agriculture*, *11*(8), 738. <https://doi.org/10.3390/agriculture11080738>
- Wu, K., Liu, J., Wang, L., Fan, S., Li, Z., Li, Y., Yi, L., Ding, H., Zhao, M., & Chen, J. (2020). Current State of Global African Swine Fever Vaccine Development under the Prevalence and Transmission of ASF in China. *Vaccines*, *8*(3), 531. <https://doi.org/10.3390/vaccines8030531>
- Wu, K., Zhang, Y., Zeng, S., Liu, X., Li, Y., Li, X., Chen, W., Li, Z., Qin, Y., Chen, J., & Fan, S. (2022). Development and Application of RAA Nucleic Acid Test Strip Assay and Double RAA Gel Electrophoresis Detection Methods for ASFV and CSFV. *Frontiers in Molecular Biosciences*, *8*. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.811824>
- Yang, J., Li, S., Feng, T., Zhang, X., Yang, F., Cao, W., Chen, H., Liu, H., Zhang, K., Zhu, Z., & Zheng, H. (2021). African Swine Fever Virus F317L Protein Inhibits NF- κ B Activation To Evade Host Immune Response and Promote Viral Replication. *MSphere*, *6*(5). <https://doi.org/10.1128/mSphere.00658-21>
- Yang, S., Miao, C., Liu, W., Zhang, G., Shao, J., & Chang, H. (2023). Structure and function of African swine fever virus proteins: Current understanding. *Frontiers in Microbiology*, *14*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1043129>
- Zakaryan, H., Cholakyans, V., Simonyan, L., Misakyan, A., Karalova, E., Chavushyan, A., & Karalyan, Z. (2015). A study of lymphoid organs and serum proinflammatory cytokines in pigs infected with African swine fever virus genotype II. *Archives of Virology*, *160*(6), 1407–1414. <https://doi.org/10.1007/s00705-015-2401-7>
- Zakaryan, H., & Revilla, Y. (2016). African swine fever virus: current state and future perspectives in vaccine and antiviral research. *Veterinary Microbiology*, *185*, 15–19. <https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2016.01.016>
- Zakharova, O. I., Korennoy, F. I., Yashin, I. V., Burova, O. A., Liskova, E. A., Gladkova, N. A., Razheva, I. V., & Blokhin, A. A. (2023). Spatiotemporal Patterns of African Swine Fever in Wild Boar in the Russian Federation (2007–2022): Using Clustering Tools for Revealing High-Risk Areas. *Animals*, *13*(19), 3081. <https://doi.org/10.3390/ani13193081>
- Zani, L., Dietze, K., Dimova, Z., Forth, J. H., Denev, D., Depner, K., & Alexandrov, T. (2019). African Swine Fever in a Bulgarian Backyard Farm—A Case Report. *Veterinary Sciences*, *6*(4), 94. <https://doi.org/10.3390/vetsci6040094>
- Zani, L., Forth, J. H., Forth, L., Nurmoja, I., Leidenberger, S., Henke, J., Carlson, J., Breidenstein, C., Viltrop, A., Höper, D., Sauter-Louis, C., Beer, M., & Blome, S. (2018). Deletion at the 5'-end of Estonian ASFV strains associated with an attenuated phenotype. *Scientific Reports*, *8*(1), 6510. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24740-1>

- Zani, L., Masiulis, M., Bušauskas, P., Dietze, K., Pridotkas, G., Globig, A., Blome, S., Mettenleiter, T., Depner, K., & Karvelienė, B. (2020). African swine fever virus survival in buried wild boar carcasses. *Transboundary and Emerging Diseases*, tbed.13554. <https://doi.org/10.1111/tbed.13554>
- Zhang, F., Hopwood, P., Abrams, C. C., Downing, A., Murray, F., Talbot, R., Archibald, A., Lowden, S., & Dixon, L. K. (2006). Macrophage Transcriptional Responses following In Vitro Infection with a Highly Virulent African Swine Fever Virus Isolate. *Journal of Virology*, 80(21), 10514–10521. <https://doi.org/10.1128/JVI.00485-06>
- Zhang, H., Zhao, S., Zhang, H., Qin, Z., Shan, H., & Cai, X. (2023). Vaccines for African swine fever: an update. *Frontiers in Microbiology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1139494>
- Zhang, J., Zhang, Y., Chen, T., Yang, J., Yue, H., Wang, L., Zhou, X., Qi, Y., Han, X., Ke, J., Wang, S., Yang, J., Miao, F., Zhang, S., Zhang, F., Wang, Y., Li, M., & Hu, R. (2021). Deletion of the L7L-L11L Genes Attenuates ASFV and Induces Protection against Homologous Challenge. *Viruses*, 13(2), 255. <https://doi.org/10.3390/v13020255>
- Zhang, K., Li, S., Liu, S., Li, S., Qu, L., Gao, G. F., & Qiu, H.-J. (2021). Spatiotemporally Orchestrated Interactions between Viral and Cellular Proteins Involved in the Entry of African Swine Fever Virus. *Viruses*, 13(12), 2495. <https://doi.org/10.3390/v13122495>
- Zheng, H.-H., Fu, P.-F., Chen, H.-Y., & Wang, Z.-Y. (2022). Pseudorabies Virus: From Pathogenesis to Prevention Strategies. *Viruses*, 14(8), 1638. <https://doi.org/10.3390/v14081638>
- Zheng, X., Nie, S., & Feng, W.-H. (2022). Regulation of antiviral immune response by African swine fever virus (ASFV). *Virologica Sinica*, 37(2), 157–167. <https://doi.org/10.1016/j.virs.2022.03.006>
- Zhou, X., Li, N., Luo, Y., Liu, Y., Miao, F., Chen, T., Zhang, S., Cao, P., Li, X., Tian, K., Qiu, H.-J., & Hu, R. (2018). Emergence of African Swine Fever in China, 2018. *Transboundary and Emerging Diseases*, 65(6), 1482–1484. <https://doi.org/10.1111/tbed.12989>
- Zhu, Y., Deng, J., Nan, M.-L., Zhang, J., Okekunle, A., Li, J.-Y., Yu, X.-Q., & Wang, P.-H. (2019). *The Interplay Between Pattern Recognition Receptors and Autophagy in Inflammation* (pp. 79–108). https://doi.org/10.1007/978-981-15-0606-2_6
- Zsak, L., Onisk, D. V., Afonso, C. L., & Rock, D. L. (1993). Virulent African Swine Fever Virus Isolates Are Neutralized by Swine Immune Serum and by Monoclonal Antibodies Recognizing a 72-kDa Viral Protein. *Virology*, 196(2), 596–602. <https://doi.org/10.1006/VIRO.1993.1515>