

Szczepionka przeciwko afrykańskiemu pomorowi świń. Obecny stan badań, trudności i perspektywy

Marek Walczak¹, Małgorzata Juskiewicz¹, Grzegorz Woźniakowski², Krzesimir Szymankiewicz¹, Katarzyna Podgórska¹

z Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach¹ oraz Instytutu Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu²

Vaccine against ASF. Current research, obstacles and perspectives

Walczak M.¹, Juskiewicz M.¹, Woźniakowski G.², Szymankiewicz K.¹, Podgórska K.¹, National Veterinary Research Institute in Puławy¹, Institute of Veterinary Sciences, Nicolaus Copernicus University in Toruń²

African swine fever virus (ASFV), causes one of the most perilous diseases of both, domestic swine and wild boar. In recent years, it has been spreading across Europe, Asia, and also North and South America. Due to ASFV transmission and persistence in the environment, widespread strategy for the control and eradication is desperately required. The commercial and smallholder swine industries need effective work plan. Culling and immediate cremation of pigs within the affected areas is often performed. In EU infected wild boars have posed a significant challenge and continuous infection pressure. ASF vaccine is not anticipated to be available very soon as a tool to assist with eradication, but the ongoing research in this area presents promising results. In this article, we highlight the latest advancements, challenges, and prospects surrounding the development of such a vaccine.

Keywords: African swine fever, eradication, control, vaccine.

Afrykański pomór świń (ASF) jest zakaźną chorobą wirusową świń, dzików oraz innych gatunków z rodziny świniowatych (*Suidae*), zwalczaną na drodze urzędowej, znajdującą się na liście Światowej Organizacji Zdrowia Zwierząt (WOAH).

Po raz pierwszy, ówczesnie występującą na terenie Kenii, jednostkę chorobową pod nazwą „afrykański pomór świń” opisał R.E. Montgomery w 1921 r. (1). Pierwsza introdukcja choroby do Europy miała miejsce w Portugalii w 1957 r., dokąd genotyp I wirusa afrykańskiego pomoru świń (ASFV) dotarł drogą morską (na statku) wraz z odpadkami, którymi karmiono świnię (2). Wirus rozprzestrzenił się na terenie Półwyspu Iberyjskiego, dotarł do Europy południowej i na wschód od Hiszpanii. Chorobę eradykowano dopiero po ok. 40 latach, za wyjątkiem Sardynii, gdzie historyczny genotyp I wirusa utrzymywał się endemicznie do 2022 r. (3, 4).

Do tej pory, na podstawie analizy sekwencji genu B646L, kodującego główne konserwatywne białko p72, wyróżniono 24 główne genotypy ASFV (5). Za obecną epizootię ASF w Europie odpowiada genotyp II ASFV, którego pierwsze pojawienie odnotowano w Gruzji w 2007 r., skąd choroba początkowo rozprzestrzeniła się na kraje wschodniej i środkowo-wschodniej Europy, docierając do Polski w 2014 r. (6, 7, 8). W 2020 r. pierwsze przypadki choroby odnotowano w Niemczech. W międzyczasie wirus rozprzestrzenił się na kontynencie azjatyckim. W 2018 r.

pierwszy przypadek ASF potwierdzono na terenie Chin – największego producenta wieprzowiny na świecie (9, 10). W 2021 r. choroba pojawiła się na Dominikanie i Haiti, zagrażając obu Amerykom. W 2022 r., po raz pierwszy od 40 lat, ASF odnotowano we Włoszech. W obecnym roku, po raz pierwszy potwierdzono występowanie ASF na fermach świń domowych w Bośni i Hercegowinie oraz Chorwacji (2, 11, 12, 13, 14).

W Europie głównym rezerwuarem wirusa jest dzik euroazjatycki (*Sus scrofa*). W populacji tych zwierząt wirus szerzy się głównie przez kontakt bezpośredni między zakażonymi osobnikami oraz przez kontakt ze zwłokami padłych dzików (15, 26, 17, 18). Ponadto, wirus może również szerzyć się drogą pokarmową i aerozoloną na niewielkie odległości, co zostało udowodnione w badaniach przeprowadzonych na świniami domowymi i dzikach (19, 20).

Czynnikiem wywołującym chorobę jest wirus afrykańskiego pomoru świń (ASFV), należący do rodziny *Asfarviridae*, rodzaju *Asfivirus*. Genom wirusa stanowi dwuniciowy kwas dezoksyrybonukleinowy (dsDNA) o wielkości od 170 do ok. 190 tys. par zasad (kpz), kodujący 151 do 167 otwartych ramek odczytu (ORF), co czyni ASFV jednym z najbardziej złożonych genetycznie wirusów (21). Po wnikięciu do organizmu żywiciela ASFV namnaża się w komórkach linii mieloidalnej, szczególnie w komórkach prezentujących antygen (APCs), takich jak monocyty, makrofagi i komórki dendrytyczne (6, 22). Wykazano również możliwość namnażania się niektórych genotypów wirusa w neutrofilach, hepatocytach, komórkach śródbłonna i nabłonka nerkowego (23, 24). Powszechnie uważa się, że największą rolę w patogenie odgrywa masowe niszczenie makrofagów, w wyniku którego dochodzi do uwalniania cytokin prozapalnych, takich jak IL-1 β i TNF- α , powodujących uszkodzenie naczyń i zmiany w strukturach limfoidalnych (25, 26, 27). Zjawisko to, określane jako tzw. burza cytokinowa, prowadzi do uszkodzeń narządów wewnętrznych i wraz ze zdolnością ASFV do unikania odpowiedzi immunologicznej gospodarza jest przyczyną wysokiej śmiertelności (nawet do 100%) zakażonych zwierząt (21, 28, 29).

Choroba niesie ze sobą ogromne straty ekonomiczne, ale również powoduje niepowetowane straty natury socjologicznej. Obecnie na rynku UE brak jest zatwierdzonej szczepionki przeciwko ASF. Prewencja choroby odbywa się głównie przez stosowanie zasad bioasekuracji, kontrolę populacji dzików, a w przypadku wystąpienia – wczesne wykrywanie i likwidację zakażonego stada wraz z wachlarzem

działań administracyjnych mających na celu kontrolę obrotem trzodą chlewną (30, 31). Wysiłki naukowców z całego świata nakierowane są na opracowanie skutecznej i bezpiecznej szczepionki przeciwko ASF. Mimo ogromnych postępów poczynionych w tym zakresie w ostatnich latach nierówna walka z chorobą trwa nadal. Artykuł ten ma na celu przedstawienie najnowszych badań oraz naświetlenie trudności, z jakimi borykają się naukowcy w procesie opracowania skutecznej i bezpiecznej szczepionki przeciwko ASF.

Trudności w opracowaniu szczepionki – złożoność genetyczna wirusa, unikanie odpowiedzi immunologicznej, rola przeciwciał w zakażeniu ASFV

Jednym z problemów w opracowaniu skutecznych szczepionek jest niedostateczny poziom wiedzy w zakresie patogenezy i immunologii zakażeń ASFV, który zaliczany jest do najbardziej złożonych genetycznie wirusów. Genom wirusa koduje od 150 do 200 białek, w tym ok. 50 odpowiadających za strukturę wirusa (32). Identyfikacja funkcji każdego genu wymaga ogromnych nakładów czasowych i finansowych. Z kolei znajomość genów odpowiedzialnych za patogenność wirusa oraz indukcję odpowiedzi immunologicznej ma kluczowe znaczenie dla powodzenia badań, niezależnie od strategii opracowania szczepionki (wektorowe, żywe atenuowane, pojednostkowe).

Część białek, kodowanych przez genom wirusa jest bezpośrednio zaangażowana w mechanizmy unikania odpowiedzi immunologicznej gospodarza (tab. 1).

W przebiegu ASF obserwuje się zaburzenia zarówno wrodzonej, jak i nabytej odpowiedzi immunologicznej, związane ze zdolnością wirusa do interferencji z mechanizmami odporności przeciw-wirusowej, m.in.:

- 1) hamowania przetwarzania i prezentacji genów MHC klasy II,
- 2) unikania limfocytów T CD8+ i zewnątrzkomórkowej sieci neutrofilowej poprzez hamowanie ekspresji chemokin rekrutujących komórki efektorowe,
- 3) hamowania aktywacji makrofagów M1,
- 4) indukowania cytokin immunosupresyjnych,

5) hamowania procesów autofagii i apoptozy makrofagów,

6) hamowania szlaków odpowiedzialnych za wydzielanie interferonów (27, 33, 34).

Złożoność reakcji immunologicznych towarzyszących zakażeniu, często udaremnia próby opracowania skutecznych szczepionek przeciwko ASF. Geny strukturalne używane w szczepionkach wektorowych lub białka wykorzystywane w szczepionkach inaktywowanych mogą indukować odpowiedź humoralną układu immunologicznego, jednak jak pokazały dotychczasowe badania, jest ona niewystarczająca do skutecznej ochrony przed zakażeniem (35, 36, 37, 38). W badaniach na surowicach pochodzących od zwierząt-ozdrowieńców, ostatecznie udowodniono, że same poliklonalne przeciwciała nie są w stanie skutecznie zablokować replikacji wirusa. Ma to prawdopodobnie związek z mechanizmem internalizacji wirusa. Wirus ASF może być wchłaniany pasywnie przez makrofagi (w procesie tzw. makropinocytozy konstytutywnej), toteż zablokowanie przez przeciwciała receptorów odpowiadających za przyłączenie się i następową internalizację wirusa nie powoduje zahamowania procesu jego replikacji (39). Dopiero synergistyczne działanie odpowiedzi typu humoralnego i komórkowego jest w stanie skutecznie zwalczać patogen, co pośrednio zostało udowodnione poprzez stworzenie szczepionek żywych-ateuowanych (LAV), zdolnych pobudzać obie komponenty układu immunologicznego.

Przez wiele lat opracowanie szczepionek typu LAV utrudniał brak możliwości namnażania szczepów ASFV należących do genotypu II (obecnie krążącego w Europie) na liniach komórkowych ciągłych. Efektywne zastosowanie technik inżynierii genetycznej (CRISPR/Cas9, homologiczna rekombinacja) wymaga bowiem wprowadzenia do linii komórkowych konstruktów genetycznych powodujących mutacje w genomie wirusa. Otrzymanie linii komórkowej, która w sposób ciągły utrzymywałaby konstrukt genetyczny, znacznie zwiększa szansę skutecznej ingerencji w genom wirusa (40). Co więcej, dzięki liniom ciągłym istnieje możliwość produkcji szczepionki na skalę przemysłową bez potrzeby kosztownego i czasochłonnego pozyskiwania komórek linii pierwotnej (monocyty, makrofagi), w których

Tabela 1. Geny kodujące białka odpowiedzialne za wirulencję ASFV i unikanie odpowiedzi immunologicznej gospodarza (21, 33)

Czynnik (białko)	Działanie w organizmie gospodarza	Gen
IAP	inhibitor apoptozy	A224L
Bcl-2	inhibitor apoptozy	A179L
IκB	homolog i inhibitor fosfatazy kalcyneuryny	A238L
C type lectin like	hamowanie aktywacji limfocytów T	EP153R
CD2-like	hemadsorpcja	EP402R
ICP34.5-like	czynnik neurowirulencji	DP71L (I14L)
Nif S-like	ochrona przed stresem oksydatywnym	QP383R
ERV 1-like	hamowanie potencjału redoks	B119L
Czynniki wielogenowe	hamowanie wydzielania interferonów	MGF505, MGF360

genotyp II ASFV posiada naturalną zdolność namnażania się. Problem ten został częściowo rozwiązany przez zespół Borca i wsp., którzy w 2021 r. opracowali linię komórkową PIPEC, posiadającą właściwości linii komórkowej ciągłej, umożliwiającą replikację genotypu II wirusa. Linia ta jest chroniona patentem USA (41).

Ze względu na rezerwuuar wirusa ważnym elementem kontrolowania choroby powinno być dostne uodpornianie dzików. Zastosowanie tej strategii pozwoliło np. na skuteczną walkę z klasycznym pomorem świń (42). Niestety, w przypadku ASF dotychczasowe próby uodporniania *per os* cechują się ograniczoną skutecznością oraz rodzą wątpliwości dotyczące bezpieczeństwa ich stosowania (43, 44). W związku z tym większość obecnych badań skupia się na opracowaniu szczepionki pozwalającej zabezpieczyć stada świń w fermach.

Najbardziej obiecujące wyniki dotyczące szczepionki przeciwko ASF

Ostatnie lata przyniosły znaczne postępy w badaniach nad opracowaniem skutecznej szczepionki przeciwko ASF, najbardziej obiecujące wyniki dotyczą szczepionek typu LAV, powstałych w wyniku modyfikacji genetycznych. W 2020 r. grupa naukowców z Plum Island (USA) opublikowała wyniki badań nad szczepionką opartą na szczepie wirusa z delecją genu 177L (ASFVG- Δ I177L). Podczas 28-dniowego okresu obserwacji po domięśniowej inokulacji szczepem ASFVG- Δ I177L u zwierząt zaobserwowano brak odstępstw od norm klinicznych, niskie poziomy wirerii, brak wydalania wirusa oraz obecność swoisty dla wirusa przeciwi ciała. Szczepionka ta zapewniała 100% ochronę przed zakażeniem szczepem rodzicielskim ASFV-G (45), natomiast w 2021 r. dowiedziono jej 100% skuteczności w podaży donosowej (46). Rok później opublikowano pierwsze badania dotyczące bezpieczeństwa szczepionki ASFVG- Δ I177L, w których nie wykazano rewersji do zjadliwości szczepu (47). Opracowano również szczep wirusowy Δ I177L Δ MGF110-5L-6L i test PCR pozwalający odróżnić zwierzęta naturalnie zakażone od zwierząt szczepionych (strategia DIVA; 48, 49). Potwierdzono też zdolność szczepionki do indukcji komórkowej odpowiedzi immunologicznej poprzez wykazanie wzrostu odsetka limfocytów T CD4+ i T CD8+ oraz stężenia interferonu gamma w 28 dniu po szczepieniu (50). Niestety w doniesieniach prasowych pojawiły się niepokojące wieści odnośnie pilotażowego szczepienia w Wietnamie, gdzie obserwowano przypadki zachorowania na ASF wśród świń szczepionych szczepem ASFVG- Δ I177L. W wyniku tego czasowo zawieszono program szczepień (51). Przyczyna padnięć zwierząt nie została dostatecznie wyjaśniona. Domniemaną przyczynę (przedawkowanie szczepionki, używanie niezgodne z zaleceniami) pojawiającą się w prasie należy uznać za wątpliwą w świetle wiedzy naukowej. W związku z szeregiem zastrzeżeń dotyczących bezpieczeństwa stosowania szczepionki ASFVG- Δ I177L, w 2023 r. zostały opublikowane wyniki badań

długoterminowych, w których nie wykazano skutków ubocznych w przeciągu 90 i 180 dni od szczepienia (52). Obecnie Wietnam jest jedynym państwem na świecie, które oficjalnie zaaprobowało dwie szczepionki przeciwko ASF, w tym opracowaną przez zespół z USA.

W Europie również trwają badania nad opracowaniem skutecznej i bezpiecznej szczepionki przeciw ASF. W 2022 r. zespół niemieckich badaczy (Deutschmann i wsp.) opublikował pracę dotyczącą badań nad żywym atenuowanym szczepem ASFV-G- Δ MGF, posiadającym delecję w rejonie rodzin wielogenowych (MGF; 44). Już w 2018 r. zauważono, że mutacje w obrębie rodzin wielogenowych MGF (najbardziej zmiennych obszarów genomu ASFV) prowadzą do atenuacji wirusa (53). Wprowadzenie delecji w tym rejonie pozwoliło na uzyskanie 100% skuteczności szczepionki po podaniu domięśniowym (świnie) i 50% skuteczności po podaniu *per os* (dziki; 44). Niestety opublikowane w 2023 r. badania nad możliwością wstecznego uzjadliwienia się szczepu ASFV-G- Δ MGF ujawniły wystąpienie przejściowej gorączki, zwiększone siewstwo i replikację wirusa, jak również zmiany w obrębie jego genomu (54). Obserwacje te stawiają pod znakiem zapytania kwestie bezpieczeństwa wymienionej szczepionki, pomimo tego w ostatnich miesiącach została ona dopuszczona do stosowania w Wietnamie. Ostatni rok przyniósł także obiecujące wyniki badań ze strony Hiszpanii. Opracowany tam szczep Arm- Δ CD2v- Δ A238L po podaniu domięśniowym zapewnił 100% skuteczność przeciwko zjadliwemu szczepowi Paju pochodzącemu z Korei (55). Obecnie brak jest badań odnośnie do bezpieczeństwa tej szczepionki.

Warto również przyrzeć się próbom opracowania szczepionki przez Chiny. W 2020 r. Chen i wsp. opublikowali dane dotyczące szczepionki zawierającej delecję siedmiu genów – HLJ/18-7GD (56). Szczepionka ta wykazywała 100% skuteczności przeciwko szczepowi homologicznemu i wg badań spełniła wymogi bezpieczeństwa. Jej skuteczność dodatkowo potwierdziły wyniki dotyczące komórkowej odpowiedzi immunologicznej (indukowanie wysokich poziomów limfocytów T CD8+ opublikowane w 2022 r. (57). W tym samym roku opublikowano również pracę przedstawiającą test ELISA pozwalający zastosować strategię DIVA dla szczepionki HLJ/18-7GD (58).

Warto nadmienić, że przytoczone badania to tylko niektóre, najbardziej zaawansowane, z wielu toczących się obecnie prób opracowania skutecznej szczepionki przeciwko ASF. Do grona szczepionek, które wykazywały się dobrą skutecznością, należy zaliczyć szczepionkę wektorową opracowaną przez zespół z Wielkiej Brytanii (59), szczepionki produkcji USA oparte o delecję genu H108R i A104R (60, 61) oraz szczepionkę opracowaną przez zespół z Francji opartą o atenuowany szczep ASFV-989, który powstał przypadkiem przy próbach termicznej inaktywacji szczepu Georgia 2007 (62).

Wyniki dotyczące opisanych szczepionek podsumowano w **tabeli 2**.

Tabela 2. Najbardziej obiecujący kandydaci na szczepionkę przeciwko ASF

Szczep bazowy	Typ	Skuteczność (droga podania)	Bezpieczeństwo	DIVA	Kraj pochodzenia	Źródło
ASFVG-ΔI177L	LAV	100% (<i>i.m.</i> , <i>i.n.</i>)	+	+	USA	(45, 46, 49, 52, 63, 64)
ASFV-G-ΔMGF	LAV	100% (<i>i.m.</i>) 50% (<i>p.o.</i>)	-	b/d	Niemcy	(44, 54)
HLJ/18-7GD	LAV	100% (<i>i.m.</i>)	+	+	Chiny	(56–58)
Arm-ΔCD2v-ΔA238L	LAV	100% (<i>i.m.</i>)	b/d	b/d	Hiszpania	(55)
ASFV-989	LAV	82% (<i>i.m.</i>) 100% (<i>i.n.</i>)	b/d	b/d	Francja	(62)
MVA- 8 antygenów	wektorowa	100% (<i>i.m.</i>)	b/d	b/d	Wielka Brytania	(59)
ASFV-G- ΔH108R	LAV	80% (<i>i.m.</i>)	b/d	b/d	USA	(60)
ASFV-G-ΔA104R	LAV	80% (<i>i.m.</i>)	b/d	b/d	USA	(61)

Objaśnienia: *i.m.* – domięśniowo, *i.n.* – donosowo, *p.o.* – doustnie, b/d – brak danych, „+” – potwierdzono/opracowano, „-” – wątpliwe, DIVA – możliwość odróżnienia świń szczepionych od zakażonych

Podsumowanie

Afrykański pomór świń pozostaje jedną z ekonomicznie najważniejszych i najniebezpieczniejszych chorób zwierząt z rodziny świniowatych. Palący problem, który wrócił na kontynent europejski w 2007 r., może rozwiązać jedynie skuteczna i bezpieczna szczepionka. Wysiłki naukowców z całego świata od ponad 60 lat skupiają się na opracowaniu szczepionki przeciwko ASF, która pomimo poczynionych postępów pozostaje wciąż niedostępna na rynku UE.

Przyczyny tego stanu powinno dopatrywać się przede wszystkim w bezpieczeństwie szczepionek. Szczepionki typu LAV osiągają bardzo dobre wyniki laboratoryjne, ale mogą nieść ze sobą ryzyko wstecznego uzjadliwiania się wirusa, wydostania się go do środowiska naturalnego i nieograniczonych możliwości rekombinacji. Przypadek pierwszych szczepień w Hiszpanii (lata 60. XX wieku) atenuowanym szczepem wirusa ASFV udowodnił możliwości jego uzjadliwienia, a w konsekwencji doprowadził do utrwalenia się epizoozji ASF (65). Ostatnie doniesienia ze świata każą jeszcze czujniej spoglądać na sytuację i zachować rozwagę w ewentualnym wprowadzaniu atenuowanych szczepionek do obrotu. W 2021 r. nielegalne szczepienia w Chinach doprowadziły do uwolnienia do środowiska nigdy niewystępującego tam genotypu I ASFV (66). W tym roku ukazały się zatrważające wieści o obecności rekombinantów dwóch genotypów (I i II), wobec których obecna szczepionka LAV jest nieskuteczna (67). Również przypadek badań pilotażowych najbardziej zaawansowanej szczepionki z USA każe podchodzić z ostrożnością do decyzji o zatwierdzeniu szczepionki. Pomimo owocnych wyników badań dotyczących bezpieczeństwa przypadki wystąpienia ASF po szczepieniu pozostają niedostatecznie wyjaśnione. Wobec przekreślonych szans na powodzenie szczepionek inaktywowanych i rozterek nad bezpieczeństwem szczepionek LAV rozwiązaniem mogłyby być szczepionki wektorowe oparte o niezjadliwe szczepy innych

gatunków prezentujące jedynie poszczególne antygeny ASFV. Jak pokazały badania z Wielkiej Brytanii sukces w zakresie skuteczności tych szczepionek jest możliwy, a brak pełnego genomu wirusa rodzicielskiego może zapewnić większe bezpieczeństwo od szczepionek LAV.

W Polsce, w Państwowym Instytucie Weterynaryjnym w Puławach, również w ramach współpracy międzynarodowej, prowadzi się badania nad możliwością zatrzymania epidemii ASF. Zakładają one zarówno próby opracowania szczepionek LAV (40), wykorzystanie surowic ozdrowieńców (39), identyfikację genów docelowych do mutacji poprzez analizę kliniczną i charakterystykę genetyczną (29, 31, 68, 69, 70), jak również wdrażanie badań umożliwiających skuteczną walkę z wirusem poprzez stosowanie sprawdzonych środków dezynfekcyjnych (71, 72). W niedalekiej przyszłości, we współpracy w ramach międzynarodowego konsorcjum, planowane są badania zmierzające do opracowania innowacyjnej platformy szczepionkowej umożliwiającej ograniczenie zdolności replikacji wirusa w szczepionkach typu LAV i poprawę ich bezpieczeństwa.

Jak pokazują obecne prace, poczyniono znaczący krok w opracowaniu skutecznej i bezpiecznej szczepionki przeciwko ASF. Być może potencjalne wprowadzenie szczepionki do obrotu będzie wyrazem kompromisu między jej skutecznością i bezpieczeństwem. Nie wiemy, co przyniesie przyszłość i z dużą pokorą patrzymy na przeciwnika, z którym najlepsze zespoły naukowe na całym świecie mierzą się przez ostatnie dziesiątki lat.

Piśmiennictwo

- Eustace Montgomery R.: On A Form of Swine Fever Occurring in British East Africa (Kenya Colony). *J. Comp. Pathol. Ther.* 1921, 34, 159–191. Doi:10.1016/S0368-1742(21)80031-4.
- Costard S., Wieland B., de Glanville, W., Jori, F., Rowlands, R., Vossloo, W., Roger, E., Pfeiffer D.U., Dixon L.K.: African Swine Fever: How Can Global Spread Be Prevented? *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 2009, 364, 2683–2696. Doi:10.1098/rstb.2009.0098.
- Sánchez-Vizcaíno J.M., Mur L., Martínez-López B.: African Swine Fever (ASF): Five Years around Europe. *Vet. Microbiol.* 2013, 165, 45–50. Doi:10.1016/j.vetmic.2012.11.030.

4. Jurado C., Fernández-Carrión E., Mur L., Rolesu S., Laddomada A., Sánchez-Vizcaíno J.M.: Why Is African Swine Fever Still Present in Sardinia? *Transbound. Emerg. Dis.* 2018, **65**, 557–566. Doi:10.1111/tbed.12740.
5. Norbert Mwiine F., Nkamwesiga J., Ndekezi C., Ochwo S.: Molecular Characterization of African Swine Fever Viruses from Outbreaks in Peri-Urban Kampala, Uganda. *Adv. Virol.* 2019, **2019**, 1–8. Doi:10.1155/2019/1463245.
6. Sánchez-Cordón P.J., Montoya M., Reis A.L., Dixon L.K.: African Swine Fever: A Re-Emerging Viral Disease Threatening the Global Pig Industry. *Vet. J.* 2018, **233**, 41–48. Doi: 10.1016/j.tvjl.2017.12.025.
7. Sánchez E.G., Pérez-Núñez D., Revilla Y.: Development of Vaccines against African Swine Fever Virus. *Virus Res.* 2019, **265**, 150–155. Doi: 10.1016/j.virusres.2019.03.022.
8. Cwynar P., Stojkov J., Wlazlak K.: African Swine Fever Status in Europe. *Viruses* 2019, **11**, 310. Doi: 10.3390/v11040310.
9. Ge S., Li J., Fan X., Liu F., Li L., Wang Q., Ren W., Bao J., Liu C., Wang H., et al.: Molecular Characterization of African Swine Fever Virus, China, 2018. *Emerg. Infect. Dis.* 2018, **24**, 2131–2133. Doi: 10.3201/eid2411.181274.
10. Woźniakowski G., Kozak E., Kowalczyk A., Pejsak Z., Niemczuk K., Pomorska-Mól M., Ljyak M.: Current Status of African Swine Fever Virus in a Population of Wild Boar in Eastern Poland (2014–2015). *Arch. Virol.* 2015, **161**, 189–195. Doi: 10.1007/s00705-015-2650-5.
11. Guinat C., Gogin A., Blome S., Keil G., Pollin R., Pfeiffer D.U., Dixon L.: Transmission Routes of African Swine Fever Virus to Domestic Pigs: Current Knowledge and Future Research Directions. *Vet. Rec.* 2016, **178**, 262–267. Doi: 10.1136/vr.103593.
12. Pejsak Z., Truszczyński M., Niemczuk K., Kozak E., Markowska-Daniel I.: Epidemiology of African Swine Fever in Poland since the Detection of the First Case. *Pol. J. Vet. Sci.* 2014, **17**, 665–672. Doi: 10.2478/pjvs-2014-0097.
13. OIE World Organization of Animal Health *African Swine Fever (ASF) – Situation Report 2021*.
14. Le Potier M.F.: African Swine Fever in Europe. *Bull. Acad. Vet. Fr.* 2021, **174**, 1–8. Doi: 10.3406/BAVF.2021.70950.
15. Probst C., Globig A., Knoll B., Franz J., Depner K., Probst C.: Behaviour of Free Ranging Wild Boar towards Their Dead Fellows : Potential Implications for the Transmission of African Swine Fever Author for Correspondence : R. Soc. *Open Sci.* 2017, **4**, 1–12. Doi: http://dx.doi.org/10.1098/rsos.170054.
16. Podgórski T., Śmietanka K.: Do Wild Boar Movements Drive the Spread of African Swine Fever? *Transbound. Emerg. Dis.* 2018, **65**, 1588–1596. Doi: 10.1111/tbed.12910.
17. Walczak M., Frant M., Juszkiewicz M., Szymankiewicz K., Bruczyńska M., Woźniakowski G., Mazur-Panasiuk N., Szymankiewicz K., Bruczyńska M., Woźniakowski G.: Vertical Transmission of Anti-ASFV Antibodies as One of Potential Causes of Seropositive Results among Young Wild Boar Population in Poland. *Pol. J. Vet. Sci.* 2020, **23**, 21–25. Doi: 10.24425/pjvs.2019.131415.
18. Cukor J., Linda R., Václavěk P., Mahlerová K., Šatrán P., Havránek F.: Confirmed Cannibalism in Wild Boar and Its Possible Role in African Swine Fever Transmission. *Transbound. Emerg. Dis.* 2020, **67**, 1068–1073. Doi: 10.1111/tbed.13468.
19. Olesen A.S., Lohse L., Boklund A., Halasa T., Gallardo C., Pejsak Z., Belsham G.J., Bruun T., Bøtner A.: Transmission of African Swine Fever Virus from Infected Pigs by Direct Contact and Aerosol Routes. *Vet. Microbiol.* 2017, **211**, 92–102. Doi: 10.1016/j.vetmic.2017.10.004.
20. 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., et al.: Infectious Dose of African Swine Fever Virus When Consumed Naturally in Liquid or Feed. *Emerg. Infect. Dis.* 2019, **25**, 891–897. Doi: 10.3201/eid2505.181495.
21. Dixon L.K., Abrams C.C., Bowick G., Goatley L.C., Kay-Jackson P.C., Chapman D., Liverani E., Nix R., Silk R., Zhang F.: African Swine Fever Virus Immunity Involved in Evading Host Defence Systems. *Immunol. Immunopathol.* 2004, **100**, 117–134. Doi: 10.1016/j.vetimm.2004.04.002.
22. Franzoni G., Graham S.P., Giudici S.D., Bonelli P., Pilo G., Anfossi A.G., Pittau M., Nicolussi P.S., Laddomada A., Oggiano A.: Characterization of the Interaction of African Swine Fever Virus with Monocytes and Derived Macrophage Subsets. *Vet. Microbiol.* 2017, **198**, 88–98. Doi: 10.1016/j.vetmic.2016.12.010.
23. Gómez-Villamandos J.C., Bautista M.J., Carrasco L., Caballero M.J., Hervás J., Villeda C.J., Wilkinson P.J., Sierra M.A.: African Swine Fever Virus Infection of Bone Marrow: Lesions and Pathogenesis. *Vet. Pathol.* 1997, **34**, 97–107. Doi: 10.1177/030098589703400202.
24. de León P., Bustos M.J., Carrascosa A.L.: Laboratory Methods to Study African Swine Fever Virus. *Virus Res.* 2013, **173**, 168–179. Doi: 10.1016/j.virusres.2012.09.013.
25. Blome S., Gabriel C., Beer M.: Pathogenesis of African Swine Fever in Domestic Pigs and European Wild Boar. *Virus Res.* 2013, **173**, 122–130. Doi: 10.1016/j.virusres.2012.10.026.
26. Salguero F., Ruiz-Villamor E., Bautista M., Sánchez-Cordón P., Carrasco L., Gómez-Villamandos J.: Changes in Macrophages in Spleen and Lymph Nodes during Acute African Swine Fever: Expression of Cytokines. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2002, **90**, 11–22. Doi: 10.1016/S0165-2427(02)00225-8.
27. Zhu J.J., Ramanathan P., Bishop E.A., O'Donnell V., Gladue D.P., Borca M.V.: Mechanisms of African Swine Fever Virus Pathogenesis and Immune Evasion Inferred from Gene Expression Changes in Infected Swine Macrophages. *PLoS One* 2019, **14**, 1–22. Doi: 10.1371/journal.pone.0223955.
28. Wang S., Zhang J., Zhang Y., Yang J., Wang L., Qi Y., Han X., Zhou X., Miao F., Chen T., et al.: Cytokine Storm in Domestic Pigs Induced by Infection of Virulent African Swine Fever Virus. *Front. Vet. Sci.* 2021, **7**. Doi: 10.3389/fvets.2020.601641.
29. Walczak M., Wasiak M., Dudek K., Kycko A., Szacawa E., Olech M., Woźniakowski G., Szczotka-Bochniarz A.: Blood Counts, Biochemical Parameters, Inflammatory, and Immune Responses in Pigs Infected Experimentally with the African Swine Fever Virus Isolate Pol18_28298_0111. *Viruses* 2021, **13**, 521. Doi: 10.3390/v13030521.
30. Juszkiewicz M., Walczak M., Woźniakowski G.: Characteristics of Selected Active Substances Used in Disinfectants and Their Virucidal Activity against ASFV. *J. Vet. Res.* 2019, **63**, 17–25. Doi: 10.2478/jvetres-2019-0006.
31. Walczak M., Żmudzki J., Mazur-Panasiuk N., Juszkiewicz M., Woźniakowski G.: Analysis of the Clinical Course of Experimental Infection with Highly Pathogenic African Swine Fever Strain, Isolated from an Outbreak in Poland. Aspects Related to the Disease Suspicion at the Farm Level. *Pathogens* 2020, **9**, 237. Doi: 10.3390/pathogens9030237.
32. Jia N., Ou Y., Pejsak Z., Zhang Y., Zhang J.: Roles of African Swine Fever Virus Structural Proteins in Viral Infection. *J. Vet. Res.* 2017, **61**, 135–143. Doi: 10.1515/jvetres-2017-0017.
33. Correia S., Ventura S., Parkhouse R.M.: Identification and Utility of Innate Immune System Evasion Mechanisms of ASFV. *Virus Res.* 2013, **173**, 87–100. Doi: 10.1016/j.virusres.2012.10.013.
34. 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., et al.: 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. *J. Virol.* 2015, **89**, 6048–6056. Doi: 10.1128/jvi.00554-15.
35. 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.: High Doses of Inactivated African Swine Fever Virus Are Safe, but Do Not Confer Protection against a Virulent Challenge. *Vaccines* 2021, **9**, 242. Doi: 10.3390/vaccines9030242.
36. Blome S., Gabriel C., Beer M.: Modern Adjuvants Do Not Enhance the Efficacy of an Inactivated African Swine Fever Virus Vaccine Preparation. *Vaccine* 2014, **32**, 3879–3882. Doi: 10.1016/j.vaccine.2014.05.051.
37. Oura C.A.L., Denyer M.S., Takamatsu H., Parkhouse R.M.E.: In Vivo Depletion of CD8+ T Lymphocytes Abrogates Protective Immunity to African Swine Fever Virus. *J. Gen. Virol.* 2005, **86**, 2445–2450. Doi: 10.1099/vir.0.81038-0.
38. Zajac M.D., Trujillo J.D., Yao J., Kumar R., Sangewar N., Lokhandwala S., Sang H., Mallen K., McCall J., Burton L., et al.: Immunization of Pigs with Replication-Incompetent Adenovirus-Vectored African Swine Fever Virus Multi-Antigens Induced Humoral Immune Responses but No Protection Following Contact Challenge. *Front. Vet. Sci.* 2023, **10**. Doi: 10.3389/fvets.2023.1208275.
39. Walczak M., Juszkiewicz M., Szymankiewicz K., Szczotka-Bochniarz A., Woźniakowski G.: ASF -Survivors' Sera Do Not Inhibit African Swine Fever Virus Replication in Vitro. *J. Vet. Res.* 2022, **66**, 21–27. Doi: 10.2478/jvetres-2022-0016.
40. Woźniakowski G., Mazur-Panasiuk N., Walczak M., Juszkiewicz M., Frant M., Niemczuk K.: Attempts at the Development of a Recombinant African Swine Fever Virus Strain with Abrogated EP402R, 9GL, and A238L Gene Structure Using the CRISPR/Cas9 System. *J. Vet. Res.* 2020, **64**, 197–205. Doi: 10.2478/jvetres-2020-0039.
41. Borca M.V., Rai A., Ramirez-Medina E., Silva E., Velazquez-Salinas L., Vuono E., Pruitt S., Espinoza N., Gladue D.P.: A Cell Culture-Adapted Vaccine Virus against the Current African Swine Fever Virus Pandemic Strain. *J. Virol.* 2021, **95**. Doi: 10.1128/JVI.00123-21.
42. Rossi S., Staubach C., Blome S., Guberti V., Thulke H.-H., Vos A., Koenen F., Le Potier M.-F.: Controlling of CSFV in European Wild Boar Using Oral Vaccination: A Review. *Front. Microbiol.* 2015, **6**. Doi: 10.3389/fmicb.2015.01141.
43. Barasona J.A., Gallardo C., Cadenas-Fernández E., Jurado C., Rivera B., Rodríguez-Bertos A., Arias M., Sánchez-Vizcaíno J.M.: First Oral Vaccination of Eurasian Wild Boar Against African Swine Fever Virus Genotype II. *Front. Vet. Sci.* 2019, **6**. Doi: 10.3389/fvets.2019.00137.
44. Deutschmann P., Carrau T., Sehl-Ewert J., Forth J.H., Viaplana E., Mancera J.C., Urniza A., Beer M., Blome S.: Taking a Promising Vaccine Candidate Further: Efficacy of ASFV- Δ MGF after Intramuscular

- Vaccination of Domestic Pigs and Oral Vaccination of Wild Boar. *Pathogens* 2022, **11**, 996. Doi: 10.3390/pathogens11090996.
45. 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.: 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. *J. Virol.* 2020, **94**. Doi: 10.1128/JVI.02017-19.
 46. 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.: ASFV-G- Δ I177L as an Effective Oral Nasal Vaccine against the Eurasia Strain of Africa Swine Fever. *Viruses* 2021, **13**, 765. Doi: 10.3390/v13050765.
 47. Tran X.H., Phuong L.T.T., Huy N.Q., Thuy D.T., Nguyen V.D., Quang P.H., Ngón Q.V., Rai A., Gay C.G., Gladue D.P., et al.: Evaluation of the Safety Profile of the ASFV Vaccine Candidate ASFV-G- Δ I177L. *Viruses* 2022, **14**, 896. Doi: 10.3390/v14050896.
 48. Ramirez-Medina E., Vuono E., Silva E., Rai A., Valladares A., Pruitt S., Espinoza N., Velazquez-Salinas L., Borca M. V., Gladue D.P.: Evaluation of the Deletion of MGF110-5L-6L on Swine Virulence from the Pandemic Strain of African Swine Fever Virus and Use as a DIVA Marker in Vaccine Candidate ASFV-G- Δ I177L. *J. Virol.* 2022, **96**. Doi: 10.1128/jvi.00597-22.
 49. Zhao K., Shi K., Zhou Q., Xiong C., Mo S., Zhou H., Long F., Wei H., Hu L., Mo M.: The Development of a Multiplex Real-Time Quantitative PCR Assay for the Differential Detection of the Wild-Type Strain and the MGF505-2R, EP402R and I177L Gene-Deleted Strain of the African Swine Fever Virus. *Animals* 2022, **12**, 1754. Doi: 10.3390/ani12141754.
 50. Attreed S.E., Silva C., Abbott S., Ramirez-Medina E., Espinoza N., Borca M. V., Gladue D.P., Diaz-San Segundo F.: A Highly Effective African Swine Fever Virus Vaccine Elicits a Memory T Cell Response in Vaccinated Swine. *Pathogens* 2022, **11**, 1438. Doi: 10.3390/pathogens11121438.
 51. Reuters Vietnam Suspends African Swine Fever Vaccine after Pig Deaths Available online: <https://www.reuters.com/world/asia-pacific/vietnam-suspends-african-swine-fever-vaccine-after-pig-deaths-2022-08-24/>.
 52. Borca M.V., Ramirez-Medina E., Silva E., Rai A., Espinoza N., Velazquez-Salinas L., Gladue D.P.: ASF Vaccine Candidate ASFV-G- Δ I177L Does Not Exhibit Residual Virulence in Long-Term Clinical Studies. *Pathogens* 2023, **12**, 805. Doi: 10.3390/pathogens12060805.
 53. Zani L., Forth J.H., Forth L., Nurmoja I., Leidenberger S., Henke J., Carlson J., Breidenstein C., Viltrop A., Höper D., et al.: Deletion at the 5'-End of Estonian ASFV Strains Associated with an Attenuated Phenotype. *Sci. Rep.* 2018, **8**, 6510. Doi: 10.1038/s41598-018-24740-1.
 54. Deutschmann P., Forth J.-H., Sehl-Ewert J., Carrau T., Viaplana E., Mancera J.C., Urniza A., Beer M., Blome S.: Assessment of African Swine Fever Vaccine Candidate ASFV-G- Δ MGF in a Reversion to Virulence Study. *npj Vaccines* 2023, **8**, 78. Doi: 10.1038/s41541-023-00669-z.
 55. Pérez-Núñez D., Sunwoo S.-Y., García-Belmonte R., Kim C., Vigarra-Astillero G., Riera E., Kim D., Jeong J., Tark D., Ko Y.-S., et al.: Recombinant African Swine Fever Virus Arm/07/CBM/C2 Lacking CD2v and A238L Is Attenuated and Protects Pigs against Virulent Korean Paju Strain. *Vaccines* 2022, **10**, 1992. Doi: 10.3390/vaccines10121992.
 56. Chen W., Zhao D., He X., Liu R., Wang Z., Zhang X., Li F., Shan D., Chen H., Zhang J., et al.: A Seven-Gene-Deleted African Swine Fever Virus Is Safe and Effective as a Live Attenuated Vaccine in Pigs. *Sci. China Life Sci.* 2020, **63**, 623-634. Doi: 10.1007/s11427-020-1657-9.
 57. Fan Y., Chen W., Jiang C., Zhang X., Sun Y., Liu R., Wang J., Yang D., Zhao D., Bu Z., et al.: Host Responses to Live-Attenuated ASFV (HLJ/18-7GD). *Viruses* 2022, **14**, 2003. Doi: 10.3390/v14092003.
 58. Wang L., Fu D., Tesfagaber W., Li F., Chen W., Zhu Y., Sun E., Wang W., He X., Guo Y., et al.: Development of an ELISA Method to Differentiate Animals Infected with Wild-Type African Swine Fever Viruses and Attenuated HLJ/18-7GD Vaccine Candidate. *Viruses* 2022, **14**, 1731. Doi: 10.3390/v14081731.
 59. Goatley L.C., Reis A.L., Portugal R., Goldswain H., Shimmion G.L., Hargreaves Z., Ho C., Montoya M., Sánchez-Cordón P.J., Taylor G., et al.: A Pool of Eight Virally Vectored African Swine Fever Antigens Protect Pigs against Fatal Disease. *Vaccines* 2020, **8**, 234. Doi: 10.3390/vaccines8020234.
 60. Vuono E., Ramirez-Medina E., Silva E., Rai A., Pruitt S., Espinoza N., Valladares A., Velazquez-Salinas L., Gladue D.P., Borca M. V.: Deletion of the H108R Gene Reduces Virulence of the Pandemic Eurasia Strain of African Swine Fever Virus with Surviving Animals Being Protected against Virulent Challenge. *J. Virol.* 2022, **96**. Doi: 10.1128/jvi.00545-22.
 61. Ramirez-Medina E., Vuono E.A., Pruitt S., Rai A., Espinoza N., Valladares A., Silva E., Velazquez-Salinas L., Borca M. V., Gladue D.P.: Deletion of African Swine Fever Virus Histone-like Protein, A104R from the Georgia Isolate Drastically Reduces Virus Virulence in Domestic Pigs. *Viruses* 2022, **14**, 1112. Doi: 10.3390/v14051112.
 62. Bourry O., Hutet E., Le Dimna M., Lucas P., Blanchard Y., Chastagner A., Paboeuf F., Le Potier M.-F.: Oronasal or Intramuscular Immunization with a Thermo-Attenuated ASFV Strain Provides Full Clinical Protection against Georgia 2007/1 Challenge. *Viruses* 2022, **14**, 2777. Doi: 10.3390/v14122777.
 63. 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.: African Swine Fever Virus Vaccine Candidate ASFV-G- Δ I177L Efficiently Protects European and Native Pig Breeds against Circulating Vietnamese Field Strain. *Transboundary Emerg. Dis.* 2021. Doi: 10.1111/tbed.14329.
 64. Velazquez-Salinas L., Ramirez-Medina E., Rai A., Pruitt S., Vuono E.A., Espinoza N., Gladue D.P., Borca M.V.: Development Real-Time PCR Assays to Genetically Differentiate Vaccinated Pigs From Infected Pigs With the Eurasian Strain of African Swine Fever Virus. *Front. Vet. Sci.* 2021, **8**. Doi: 10.3389/fvets.2021.768869.
 65. Pejsak Z., Truszczyński M.: Szczepionka przeciwko afrykańskiemu pomorowi świń. *Życie Wet.* 2020, **95**, 358-361.
 66. Sun E., Huang L., Zhang X., Zhang J., Shen D., Zhang Z., Wang Z., Huo H., Wang W., Huangfu H., et al.: Genotype I African Swine Fever Viruses Emerged in Domestic Pigs in China and Caused Chronic Infection. *Emerg. Microbes Infect.* 2021, **10**, 2183-2193. Doi: 10.1080/22221751.2021.1999779.
 67. Zhao D., Sun E., Huang L., Ding L., Zhu Y., Zhang J., Shen D., Zhang X., Zhang Z., Ren T., et al.: Highly Lethal Genotype I and II Recombinant African Swine Fever Viruses Detected in Pigs. *Nat. Commun.* 2023, **14**, 3096. Doi: 10.1038/s41467-023-38868-w.
 68. Walczak M., Szczotka-Bochniarz A., Żmudzki J., Juszkiewicz M., Szymankiewicz K., Niemczuk K., Pérez-Núñez D., Liu L., Revilla Y.: Non-Invasive Sampling in the Aspect of African Swine Fever Detection—A Risk to Accurate Diagnosis. *Viruses* 2022, **14**, 1756. Doi: 10.3390/v14081756.
 69. Mazur-Panasiuk N., Woźniakowski G., Niemczuk K.: The First Complete Genomic Sequences of African Swine Fever Virus Isolated in Poland. *Sci. Rep.* 2019, **9**, 4556. Doi: 10.1038/s41598-018-36823-0.
 70. Mazur-Panasiuk N., Walczak M., Juszkiewicz M., Woźniakowski G.: The Spillover of African Swine Fever in Western Poland Revealed Its Estimated Origin on the Basis of O174L, K145R, MGF 505-5R and IGR 173R/1329L Genomic Sequences. *Viruses* 2020, **12**. Doi: 10.3390/v12101094.
 71. Juszkiewicz M., Walczak M., Mazur-Panasiuk N., Woźniakowski G.: Effectiveness of Chemical Compounds Used against African Swine Fever Virus in Commercial Available Disinfectants. *Pathogens* 2020, **9**, 878. Doi: 10.3390/pathogens9110878.
 72. Juszkiewicz M., Walczak M., Mazur-Panasiuk N., Woźniakowski G.: Virucidal Effect of Chosen Disinfectants against African Swine Fever Virus (ASFV) – Preliminary Studies. *Pol. J. Vet. Sci.* 2019, **22**, 777-780. Doi: 10.24425/pjvs.2019.131407.