



Вирус на Африканска чума по свинете (ASFV) – нови молекулярни техники в диагностиката

Научен обзор

Вирусът на африканската чума по свинете (ASFV) е единственият известен ДНК арбовирус и способността да се възпроизвежда в клетките на насекоми и бозайници е кодирана в неговия вирусен геном. Въпреки че има относително **ниска способност за геномни мутации**, ASFV демонстрира **генетично разнообразие в определени гени и сложност на геномното съдържание в други геномни региони**, което показва, че ASFV може да използва множество механизми за диверсификация и да придобие нови фенотипни характеристики.

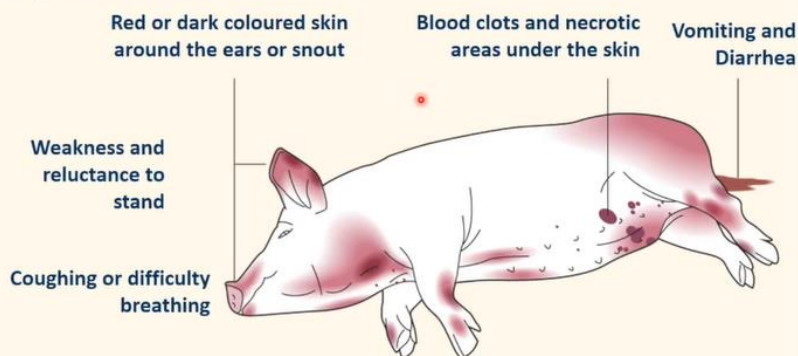
Вирусът на африканската чума по свинете (ASFV) е единственият член на семейство *Asfarviridae* (Alonso *et al.*, 2018) и е уникален, въпреки че споделя структурни, геномни и репликационни характеристики с други нуклео-цитоплазмни големи ДНК вируси (NCLDV). ASFV продуктивно се размножава в кърлежи (от рода *Ornithodoros*) и при свине от семейство *Suidae* и циркулира между двете в естествения силватичен цикъл на предаване в Африка. Въпреки няколко успешни опита все още малко се знае за вирусните детерминанти, отговорни за преноса и циркулацията в различните гостоприемници (Burrage *et al.*, 2004; Rowlands *et al.*, 2009). При домашни и диви свине (*Sus scrofa*) ASFV може да бъде **високопатогенен и да причини хеморагична, силно смъртоносна болест АЧС**.

ASFV причинява **трансгранични епидемии от АЧС**. През последните години АЧС се разпространи драстично и сега представлява **заплаха за производството на свине в световен мащаб** (Cisek *et al.*, 2016; Jurado *et al.*, 2018; Kyuro *et al.*, 2017; Nurmoja *et al.*, 2017; Sanchez-Cordon *et al.*, 2018; Vergne *et al.*, 2017). Все по-често се появяват тревожни съобщения за **огнища от африканска чума по свинете в Европа** и последно в Югоизточна Азия (Bao *et al.*, 2019; Garigliany *et al.*, 2019; Le *et al.*, 2019). Понастоящем **няма безопасна ваксина за контрол на АЧС**. Въпреки че предишни проучвания показват, че защитният имунитет срещу АЧС е постижим, проблемите с вирулентността, имуногенността и, което е важно, вирусното фенотипно и антигенно разнообразие и липсата на щам на кръстосан защитен имунитет продължават да са проблем при ваксинацията срещу АЧС (Arias *et al.*, 2017; Revilla *et al.*, 2018).

African Swine Fever (ASF)

- Devastating haemorrhagic disease in domestic pigs
 - Affects pigs of all ages
 - Miscarriage, Stillbirths and Weak litters
 - Sudden death within 10 days of infection

– Variable clinical signs:



Source: The Pirbright Institute | Reuter Graphic

Ключът към разбирането на ASFV разнообразието, включително вирусната биология, повлияна от него и еволюцията, която го движи, е **разбирането на генетичните и геномните вариации на ASFV**. За оценка на генетичното разнообразие на ASFV са използвани няколко конкретни генетични цели. Генът на ASFV, кодиращ основен капсиден протеин (p72) (B646L) е една от първите генетични цели, използвани за широкомащабна оценка на генетичното разнообразие на ASFV (*Bastos et al., 2003*). Въз основа на частичното гено секвениране B646L, *Bastos* и колеги идентифицират 22 ASF генотипа и така установяват стандартния ASFV генотипен маркер.

African Swine Fever Virus (ASFV)

Asfivirus, *Asfarviridae* family

Large, icosahedral virion (170-190 nm diameter)

dsDNA genome of ~190kb

>180 orfs

Highly repetitive

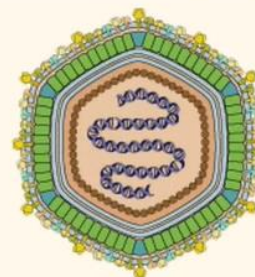
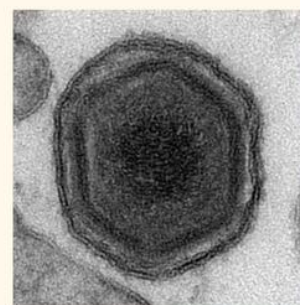
Slow mutation rate

Large recombinations possible

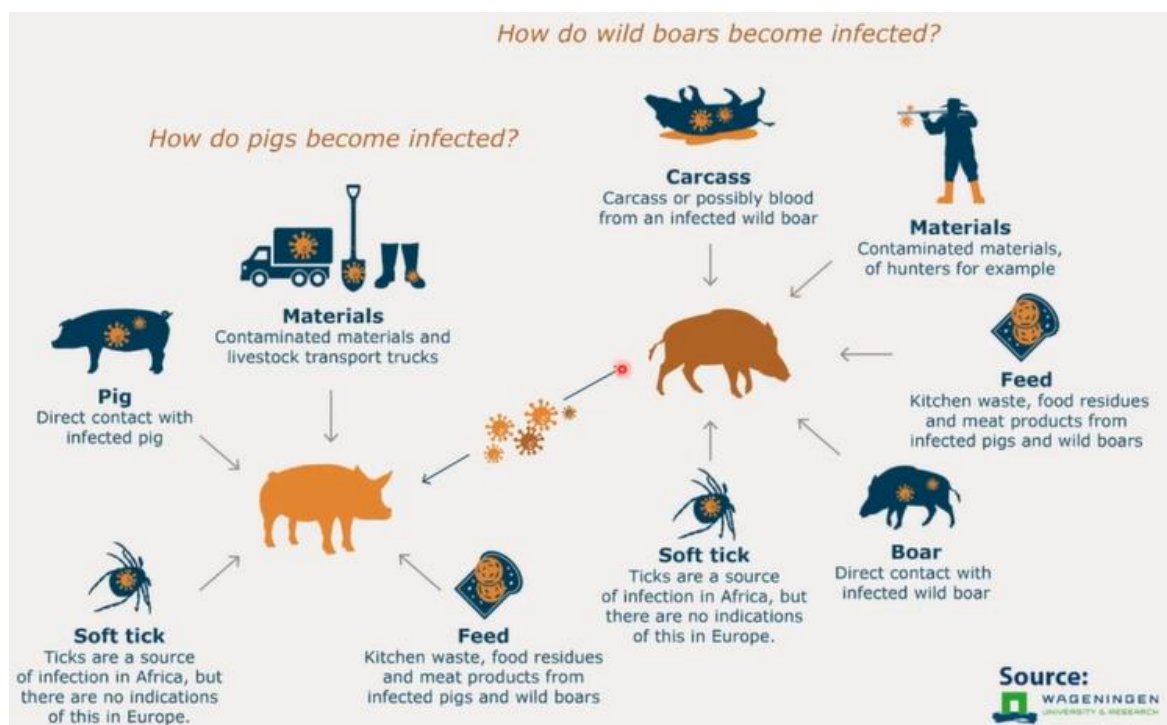
Tropism for cells of the **monocyte / macrophage** lineage

Very stable

- Stable for months
- Survives meat maturing, cooking, smoking, curing, air drying, salting and freezing



Охарактеризирането на генотип B646L позволява сравнително бързо и лесно категоризиране на ASFV щамове и остава първият метод за идентифициране на произхода на ASFV в случай на разпространение на вируса в нови територии. Анализът на генотипа на р72 не винаги осигурява адекватна резолюция за разграничаване между вирусите и на биологичния фенотип (*Malogolovkin et al., 2015*). Повишена генотипна разделителна способност е постигната чрез допълнителна оценка на гените, кодиращи експресията на р54(E183L), р30 (CP205L) и B602L (*Bastos et al., 2004; Lubisi et al., 2007, 2005 г.; Gallardo et al., 2009; Nix et al., 2006*). Широкомасщабни молекулярно епидемиологични проучвания, използващи африкански изолати на ASFV, разкриват **тревно разнообразие от варианти на ASFV в целия африкански континент** (*Alkhamis et al., 2018; Fasina et al., 2010; Nix et al., 2006*). Комбинираните данни за генотипа на ASFV и епидемиологичните данни са използвани за свързване на генетичното разнообразие на ASFV с цикъла на предаване и броя на участващите гостоприемници (*Lobisi et al., 2005; Quembo et al., 2018; Thoromo et al., 2016*). Най-голямо разнообразие от генотипове на ASFV е идентифицирано в държавите от Източна Африка, където се наблюдава силватичен цикъл на предаване (*Jorri et al., 2013; Quembo et al., 2018*).



Начини на разпространение на ASFV

Съвременните проучвания показват, че вероятно съществуват допълнителни генотипове на ASFV (*Achenbach et al., 2017*) и че други генетични маркери могат да се използват за интрагенотипна класификация (*Gallardo et al., 2014*). **Последните постижения в целогеномното секвениране (WGS) могат да осигурят цялостно генотипиране и данни, които са от решаващо значение за изясняване на биологията и разнообразието на ASFV.** Въпреки че броят на геномите на ASFV, налични в

публичните бази данни, се е увеличил, все още са **необходими допълнителни геномни последователности** на допълнителни исторически и отделни изолати на ASFV.

Данни за разпространението на ASFV в България

От началото на 2019 г. са съобщени 41 огнища на АЧС в 14 от 28 региона на България.

Общо осем промишлени свинеферми, три семейни ферми (малки търговски ферми с ниво на биосигурност) и 25 ферми тип заден двор и пет свинеферми с ИБС са засегнати и почти **1 420 000 свине са умъртвени и загробени**.

Първото огнище е потвърдено на 3 юли 2019 г. в Плевенска област, северна България, зона, считана за високорискова в близост до границата с Румъния. Огнището е потвърдено в село Жернов, в нерегистрирано стопанство тип заден двор след уведомление за повишена смъртност на прасетата. Общо са съобщени 12 огнища в стопанства тип заден двор в резултат на съмнение за АЧС, съобщени от собственика, а 10 са открити при изпълнение на надзорните програми в рамките на 10 км надзорни зони около огнищата.

След епидемиологично проучване, извършено в тези стопанства тип заден двор, където огнището е потвърдено за първи път, са разгледани няколко хипотези за въвеждането на вируса:

- Човешки фактор (висока вероятност):
 - установено е, че собственикът на стопанството пътува в чужбина до засегнатите страни;
 - има посещения на ловци и ветеринарен техник (включително в други села с огнища и на съседни общини, които също са потвърдени по-късно с огнища).
- Замърсени превозни средства (висока вероятност):
 - стопанството е разположено на транзитен път с Румъния, като ежедневно преминават значителен брой превозни средства и камиони;
 - замърсена техника и превозни средства на собственика често са в движение, включително в чужбина. В допълнение, не са били въведени процедури и мерки за биосигурност в стопанството.
- Фуражи (умерена вероятност):
 - прасетата са хранени със собствен фураж, не е посочено хранене с остъци от човешка храна, но е събрана информация, че собственикът е хранил кучетата в двора (в непосредствена близост до прасетата) с остатъци от човешка храна (включително остатъчни продукти от свинско месо).
- Директен контакт с диви свине (малка вероятност):
 - прасетата са отглеждани в добре оградени бетонни помещения, външният двор на стопанството не е изцяло ограден, тъй като задната част на двора граничи с нива.
- Незаконно придвижване на животни в стопанството (изключено):
 - не са внесени нови животни през месеците, предшестващи потвърдението на огнището.

АЧС в индустриалните ферми е установена при пасивен мониторинг (ежеседмично вземане на проби от умрели животни за всяка производствена единица, съгласно стратегическия подход за управление на АЧС в ЕС).

От септември 2019 г. са потвърдени общо 162 случая на АЧС при дива свиня в 14 области на страната. Засегнатата зона е с големина над 200 km² в случай, че в района се открият положителни диви свине. Засегнатата зона е създадена съвместно с Ветеринарната служба и Агенцията по храните. Мерките в засегнатата област са описани в Таблица 1.

Домашните свине в засегнатите райони също са включени в системата за наблюдение. Никакви други дейности, като рязане на дървета, обработка на земеделска земя, бране на билки или гъби, не се допускат.

Допълнителни мерки и дейности:

- редовни срещи със заинтересовани страни (Изпълнителна агенция по горите (ИАГ), ловни организации и сдружения, свиневъден сектор) на регионално и централно ниво;
- обучение по мерките за биосигурност по време на лов, епидемиология, вземане на проби и за контрол на АЧС.
- Изготвяне на информационни материали, брошури, флайери, кампании за повишаване на осведомеността;
- изисквания за специални ями/трапове за трупове на диви свине и обезвреждане на странични животински продукти във всяко ловно стопанство;
- ограда по сухопътната граница с Румъния;
- доказани източници на постъпване на вируса сред домашни свине (пряк/непряк контакт);
- доказано, медирано от човека, разпространение сред популацията диви свине.

Within the 2 months since the latest ASF case ascertained	2-4 months since the latest ASF case ascertained	4-6 months since the latest ASF case ascertained	More than 6 months since the latest ASF case ascertained
Restricted access and placing tables Ban on hunting Total ban on feeding wild boar Biosecurity Searching Entering data into the Hunting Module	Biosecurity Individual hunting Traps Searching Ban on feeding Entering data into the Hunting Module The wild boar shot should be ASFV tested and buried Testifying document signed by an official veterinarian	Biosecurity Individual hunting Traps Team hunting without dogs Increased vigilance Entering data into the Hunting Module The wild boar shot should be ASFV tested Refrigerators	Biosecurity Individual hunting Traps Team hunting Increased vigilance Entering data into the Hunting Module The wild boar shot should be ASFV tested

Табл. 1: Мерки, предприети в засегнатата област в България

За 2020-2021г. са отчетени като цяло **по-малко огнища, наблюдавани в домашните свинеферми**. През отчетния период има **пет огнища**: две огнища в промишлени ферми, едно огнище в семейна ферма, един случай в свинеферма за ИБС и едно огнище във ферма тип заден двор. Засегнати са **общо 13 732 животни**. Всички

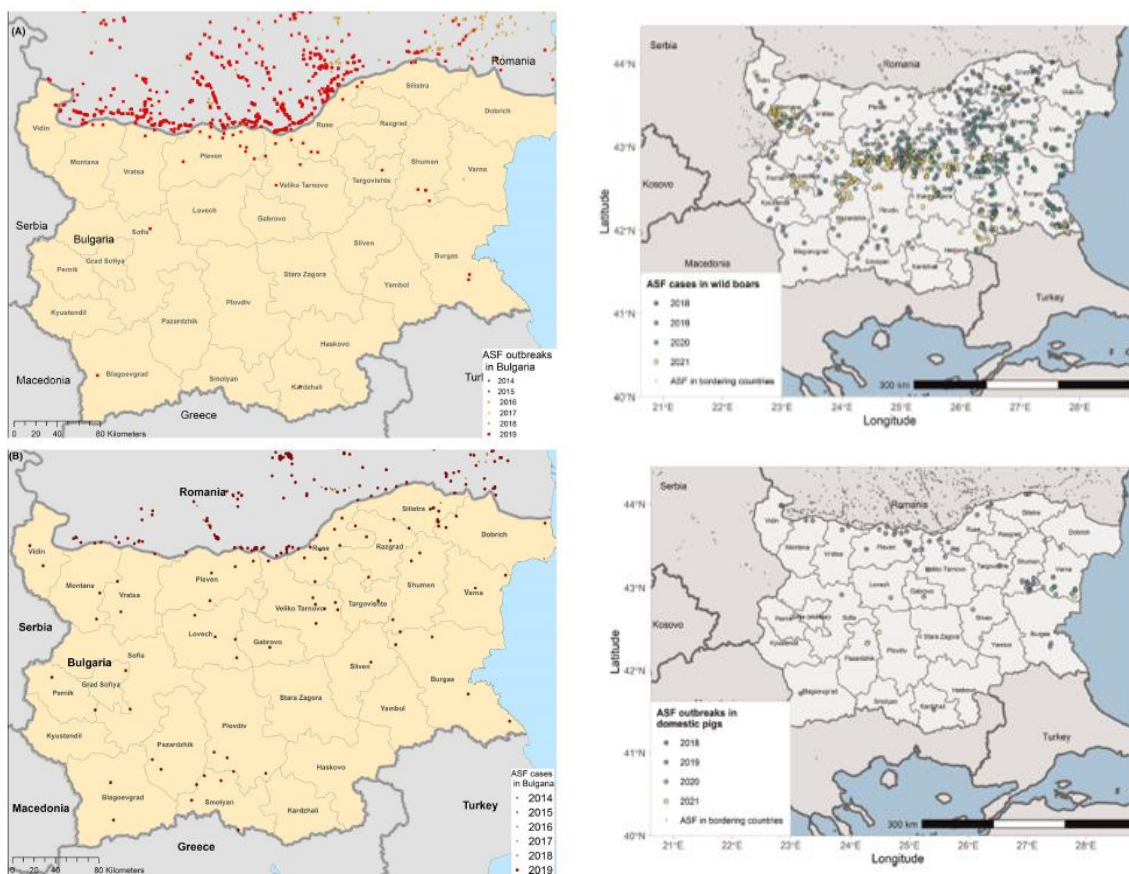
огнища на АЧС при домашни свине са потвърдени през есента, между август и началото на октомври. Наблюдава се и **тенденция за намаляване на положителните за АЧС диви свине** в сравнение с данните от предходния отчетен период. Регистриран е спад на случаите в Северна България. Положителните за АЧС диви свине са потвърдени в централен регион на страната, за разлика от ситуацията от предходния отчетен период, когато АЧС се наблюдаваше предимно в северната част на страната. Това може да се дължи на придвижване на диви свине от места, засегнати от африканска чума по свинете, към райони, които преди това са били свободни от вируса.

Основните фактори, които играят роля като двигател за постъпване на вируса в домашните свинеферми, се дължат на **разпространението, медирано от човека, и ниските нива на биосигурност**. В индустриалните ферми има добра биосигурност, но са открити слабости в управлението и поведението на персонала. Въпреки този факт, болестта се разпространява много бавно в стопанствата.

Огнища в търговските ферми са открити като част от засиленото пасивно наблюдение, което доказва ключовата роля на тази система за наблюдение за ранно откриване на заболяването. И в двете търговски ферми, заразени с АЧС, са открити мъртви диви свине в близост (1,5 км). В тези ферми не е извършвано нито домашно клане, нито хранене с остатъци. Въвеждането на АЧС в свинефермите и фермите за ИБС най-вероятно се дължи на нарушения в прилагането на мерките за биосигурност.

Специфичните мерки за превенция и контрол, приложени през отчетния период, посочени в обобщения доклад за зоонозите, изготвен от ЕОБХ, са:

- Активно наблюдение (четири пъти годишно) и засилено пасивно наблюдение (мъртви прасета) в свиневъдните обекти.
- Прилагане на план за действие за контрол (регистрация/ идентификация/ превенция на заболявания/ повишаване на биосигурността) в задните дворове.

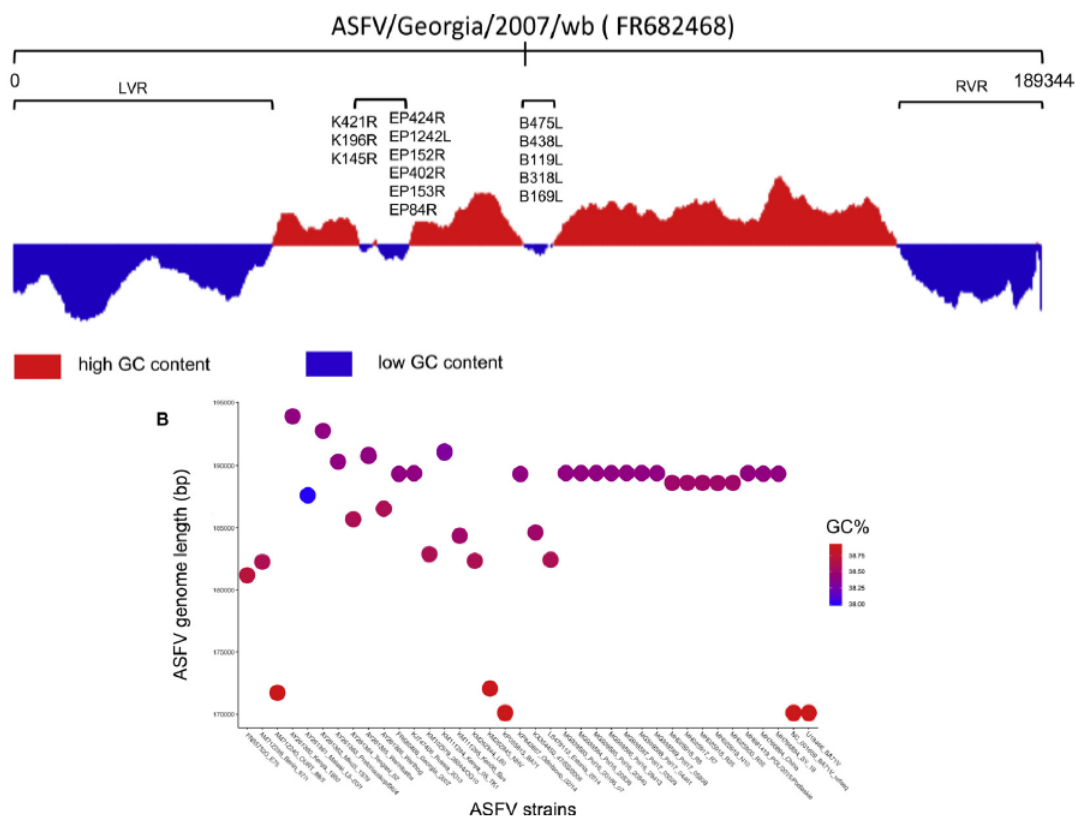


Карти на разпространение на ASFV сред домашни и диви свине за периода 2019-2021г. в България

Гени и геном на ASFV

Геномната организация на ASFV прилича на тази на другите NCLDV вируси. Понастоящем секвенираните геноми на ASFV варират по дължина, като са с размер от 170 101 до 193 886 базови двойки. Линеината геномна структура на ASFV, подобна на други NCLDV, съдържа относително сходно, еволюционно стабилно и централно локализирано „ядро“ от свързаните с репликацията гени, чиито функции са структурни и/или ензимни и отразяват изискванията на цитоплазмената репликация на сложен ДНК вирус (*Dixon et al., 2013; Rodriguez et al., 2015*). Много ASFV гени са идентифицирани въз основа на хомологията с шарковите вируси (*Dixon et al., 2013; Galindo, Alonso, 2017*) и на база задълбочена генна онтология на ASFV референтния щам BA71V по отношение и на други щамове (*Chapman et al., 2008; Rodriguez et al., 2015; Yáñez et al., 1995*). Функциите обаче на много основни гени на ASFV все още са неизвестни. В рамките на основния регион няма „горещи“ променливи генни локуси и интергенни региони (напр. централен променлив регион или CVR), които понастоящем се използват за генотипиране на ASFV, което допълва стандартното генно типизиране на p72 с допълнителни данни с висока разделителна способност (*Gallardo et al., 2014; Phologane et al., 2005*). Сравнителните геномни анализи също така са идентифицирали редица отделни гени, разпределени както вътре, така и извън геномното ядро, като са подложени на секвениране и са класифицирани като **най-променливите ортолози** на

гените в ASFV - **CD2v/ EP402R** и **C-type-lectin/EP153R**, които в крайна сметка представляват източник на генетична диверсия сред изолатите на ASFV (*Chapman et al., 2011; de Villiers et al., 2010*). Интересното е, че CD2v/EP402R също е установено, че е от съществено значение за репликацията на вируса при кърлежи (*Rowlands et al., 2009*).



Изглед на секвенирани генни локуси в генома на ASFV

A Gene Deleted	B Function	C Isolate	D Growth in cells	E Virulence in pigs
DNA repair pathway, genome integrity and nucleotide metabolism				
Q174L	DNA repair polymerase X	BA71 V (a)	Required for efficient macrophage growth	ND
E296R	AP endonuclease	BA71 V (a)	Required for macrophage growth	ND
E165R	dUTPase	BA71 V (a)	Required for macrophage growth	ND
A240L	Thymidine kinase	Malawi (v) Haiti (v)	Required for macrophage growth	Attenuated Partial protection
Type I Interferon Response				
MGF360 MGF 505/530	Type I Interferon Inhibitors	Benin 97/1(v)	No effect	Attenuated Good protection
MGF360 MGF 505/530	Type I Interferon Inhibitors	Pr4 (v)	No effect	Attenuated Good protection
MGF360 MGF 505/530	Type I Interferon Inhibitors	Georgia (v)	No effect	Attenuated Good protection
DP96R(UK)	IFN inhibitor	Malawi (v)	No effect	Attenuated Induced protection
EP402R/CD2v	Binding to red blood cells	BA71 (v)	No effect	Attenuated Good protection
EP402R/CD2v/8-DR	Binding to red blood cells	Malawi LIL20/1(v)	No effect	Delay in clinical signs
B119L(9 GL)	morphogenesis	Malawi (v)	Reduced replication	Attenuated Induced protection
B119L(9 GL)	morphogenesis	Georgia (v)	Reduced replication	At low doses attenuated and Induced protection
DP96R(UK) B119L (9 GL)		Georgia (v)	Reduced replication	Attenuated Induced protection
MGF 360 MGF 505/530 9 GL	IFN inhibitor morphogenesis	Georgia (v)	Reduced replication	Attenuated No protection
A224L/4CL	IAP apoptosis inhibitor	Malawi (v)	No effect	No reduction in virulence
DP71 L/NL		Malawi (v) Pr4 (v)		
DP71 L/NL		E70 (v)		Attenuated Induced protection
L83L DP148R	IL-1beta binding protein	Georgia (v) Benin 97/1 (v)	No effect No effect	No reduction in virulence Attenuated Induced protection
EP153R A238L	C-type lectin Inhibitor of inflammatory responses	Malawi (v) Malawi (v)	No effect No effect	No reduction in virulence No reduction in virulence
L11 L	Transmembrane	Malawi (v)	No effect	No reduction in virulence

Не-есенциални гени, идентифицирани в генома на ASFV генома заедно с техните функции

Терминално разположените региони на линейния геном на ASFV са променливи по размер и гено съдържание от основния регион и се наричат леви и десни променливи региони (LVR и RVR). ASFV терминалните геномни региони са съставени от доминантни многогенни семейства (MGF) от параложни гени. Пет MGF (MGF100, MGF110, MGF300, MGF360, MGF505) са посочени въз основа на средната им дължина на аминокиселинната последователност и вероятно са получени чрез гено дублиране и диверсия, и имат висока вариабилност при различните щамове ASFV (Almendral et al., 1990; Chapman et al., 2008; Dixon et al., 2013; González et al., 1990; Pires et al., 1997; Yozawa et al., 1994). Интригуващо е, че MGF не са подобни с други известни гени.

В някои лабораторно адаптирани щамове на ASFV и теренни изолати са били засегнати големи участъци на MGF-регионите. Прогресивното **адаптиране на ASFV щам Georgia/2007 към клетъчната линия Vero** е довело до затихване на вируса и **придобиване на многобройни мутации** в изменчивата част от вирусния геном, включително дълъг участък от нуклеотидни делеции, наблюдавани в MGF505 (*Krug et al., 2015*). Въпреки че атенюираният вирус от Грузия/2007 г. показва отслабен вирулентен фенотип, той също така е загубил имуногенен потенциал и не е защитил свинете от излагане на вируса. Подобни модели на ASFV MGF флексибилност са открити в други щамове на ASFV, адаптирани към клетъчни култури (*Chapman et al., 2008; Tabarés et al., 1987*). В последващо проучване, използващо функционален геномен подход, няколко групи са показали, че **функциите на вирулентност, свързани с MGF360 и MGF505, са един от факторите на вирулентност и могат да бъдат използвани за бъдещо разработване на ваксина** (*O'Donnell et al., 2016, 2015; Reis et al., 2016*). Значението на региона MGF360/530 като детерминанта на обхвата на гостоприемника е демонстрирано чрез делеция на шест MGF360 и два MGF530 гена от ASFV Pr4, което постепенно намалява вирусната репликация в заразените кърлежи до 1000 пъти. Разнообразието на MGF110 е наблюдавано в ASFV теренни изолати и адаптирани на клетъчни култури вируси (*Chapman et al., 2008; Almendral et al., 1990; De La Vega et al., 1990*), включително наскоро в izolata ASFV от Естония/2014 г., където 12 от 14 MGF110 гени са били част от голяма LVR делеция, свързана с атенюиран фенотип (*Zani et al., 2018*).

Континенталните епидемии, произтичащи от първоначалното огнище в Грузия от 2007 г., дадоха представа за многогодишното, широкомащабно разпространение на клоналния щам на огнището на АЧС — как се развива и разнообразието, генерирано в географски и времеви мащаби. От първата нотификация на ASFV в Източна Европа, броят на депозираните налични ASFV последователности се е увеличил. **Генните последователности на ASFV от Естония, Полша, Латвия, Литва показват висока стабилност на генома на ASFV и > 99 % хомология с родителския тип ASFV/Georgia/2007/wb (FR682468)**. Независимо от това, **множество единични нуклеотидни промени са били идентифицирани в настоящите изолати на ЕС за ASFV в различни гени и интергенни региони, включително някои, които предвиждат изместване на рамката на четене и съкращаване на транслираните протеини** (*Fraczyk et al., 2016; Gallardo et al., 2018a, 2018b; Śmietanka et al., 2016, Forth et al., 2019*). Биологичните функции и значимостта на тези малки промени все още трябва да бъдат допълнително изследвани и напълно разбрани посредством нови геномни техники като пълен геномен секвентен анализ.

Интересното е, че съдържанието в генома на ASFV на участъци, богати на GC е средно 38% за повечето щамове, въпреки че районите с относително ниско съдържание на GC се намират в LVR и RVR и в избрани централни региони. **Намаляването на съдържанието на GC може да има съществена роля в еволюцията на вируса, както е показано за други организми** (*Šmarda et al., 2014*).

Въпреки дългата история на изследванията на ASFV и опустошителния трансграничен потенциал, **броят на публично достъпните ASFV пълни геномни последователности е ограничен**. *GenBank* съдържа **42 пълни ASFV геномни**

секвенции, и от тези само 33 са теренни щамове. Необходими са по-пълни набори от данни за последователностите на ASFV и по-обстойни изпитвания на конкретни генни локуси за по-добро разбиране на пластичността на вирусния геном, антигенното разнообразие и еволюцията.

Въпреки че познанията за еволюцията на ASFV са непълни, ASFV вероятно използва различни механизми за генериране на разнообразие, при захващане на единични нуклеотидни мутации, вмъкване/изтриване, генна дупликация и рекомбинация (Dixon *et al.*, 2013). Като цяло скоростта на вирусната ДНК мутация е пониска от тази при РНК вирусите и варира между 10^{-8} - 10^{-6} замествания на нуклеотид на клетъчна инфекция (Sanjuan *et al.*, 2010), въпреки че изследователите са на мнение, че еволюционната скорост на мутация в двойноверижната вирусна ДНК е трудно да се изчисли (Firth *et al.*, 2010). Скоростта на еволюция за избрани гени на ASFV (B646L, CP204 L и B602 L/ CVR) е оценена с помощта на Bayesian статистика и може да се доближи до тези на РНК вирусите (6.9×10^{-4} /място/година за B646L) и $6,6 \times 10^{-4}$ (CP204L) (Michaud *et al.*, 2013). Обстойно проучване на изолати ASFV от Източна Африка показва увеличение на броя на дребномащабните, тандемни повторения (TRS) в гена B602L (Lobisiet *et al.*, 2007, 2005). При щама ASFV, който понастоящем причинява евразийски епидемии, TRS са отбелязани в интергенния регион I73R/I329 L сред изолатите от Кавказ, Русия и Европа (Gallardo *et al.*, 2014; Goller *et al.*, 2015; Kolbasov *et al.*, 2018). Много други натрупани мутации са отбелязани в различни гени в европейските и китайските изолати на АЧС от 2014 г. до 2018 г. (Bao *et al.*, 2019; Cisek *et al.*, 2016; Gallardo *et al.*, 2018; Garigliany *et al.*, 2019; GE *et al.*, 2018; Smietanka *et al.*, 2016; Zhou *et al.*, 2018). Биологичната значимост и връзката между тези малки нуклеотидни мутации и ASFV фенотипа често са неясни.

За разлика от единичните нуклеотидни мутации, **вариациите в генното съдържание могат по-лесно да обяснят дълбоките промени във вирусния фенотип** (Zani *et al.*, 2018). ASFV мултигенните семейства (MGF) от параложни гени са най-променливите генетични компоненти, които претърпяват драматични вариации в генното съдържание спрямо останалата част от генома и демонстрират **дублиране на гените, дивергенция на секвенцията, генна делеция и рекомбинация, които могат значително да повлияят на геномната структура на ASFV** (De La Vega *et al.*, 1990; Yáñez *et al.*, 1995). Възможно е дублирането на MGF гените на ASFV да осигури гъвкавост при вирусната адаптация към променящите се гостоприемници или защита на гостоприемника. Щамовете на ASFV, съдържащи множество копия на MGF, имат по-големи геноми и често са свързани с **по-вирулентен фенотип**, особено когато намаляването на загубата на MGF настъпва чрез вирусна адаптация в клетъчни линии *in vitro* (Chapman *et al.*, 2008; Krug *et al.*, 2015; Rodríguez *et al.*, 2015).

Предполага се, че е налице **рекомбинация, описана като основен двигател на еволюционната промяна** (Barton, 2010), между щамовете на ASFV, но все още не е ясно доказано. Докато събития на рекомбинация са били идентифицирани между хомоложни щамове на вируса по време на смесена експериментална инфекция *in vitro*, подобни все още не са доказани при огнище с ASFV. Филогенетичните промени показват събития на **рекомбинация на ASFV в гените MGF, E183 L, B602 L, EP153R**

и EP402R (CD2v). Как потенциалната рекомбинация съвпада с разнообразието на ASFV или обръква неговия анализ, изисква допълнителна оценка и анализи. Тези еволюционни процеси за генериране на изменчивост са от голям интерес, тъй като те водят до промени в специфичните гени и кодират антигени и потенциално влияят на стратегиите за ваксинация или на стабилността и ефективността на ваксините.

Антигенното разнообразие на ASFV е също ключов компонент, който възпрепятства разработването на ваксини срещу ASFV. Доказана е хомоложна защита за множество щамове и изолати на ASFV. Въпреки това експерименталното заразяване с ASFV все още представлява предизвикателство за имунния отговор, генериран срещу един единствен вирусен серотип, което обръква кръстосания защитен имунитет (*King et al., 2011; Sanchez- Cordon et al., 2017*). **Съвременните постижения в протеомиката демонстрират сложността и гъвкавостта на ASFV протеома** (*Alejo et al., 2018*) и са довели до **откриването на няколко нови ASFV протеини** (*Kessler et al., 2018*). ASFV протеомът е динамична единица, строго регулирана от вирусни и клетъчни механизми, и по този начин може значително да варира в зависимост от вирусния щам и клетките гостоприемници. Протеомиката също така показва различни ефекти на живите атенюирани ASFV щамове върху протеома на гостоприемника.

ASFV е уникален вирус от семейство *Asfarviridae*. Почти век от първия доклад за африканска чума по свинете от Монтгомъри през 1921 г. и **болестта заплашва световната популация от свине повече от всякога**. Разнообразието и сложността на ASFV са основните фактори, които възпрепятстват развитието на ваксините. **Разбирането на разнообразието в геномите на ASFV от различни гостоприемници ще помогне да се разкрият нови аспекти на еволюцията на ASFV и детерминантите, които придават антигенна и фенотипна вариация** — необходимо е допълнително секвениране на целия геном на исторически и различни теренни щамове ASFV. Хемадсорбцията и сравнителната геномика на базата на ASFV CD2v осигуряват солидно средство за идентифициране на генетичните вариации, свързани с вирусния антигенен фенотип и кръстосания защитен имунитет. Идентификацията на допълнителни серотип-специфични защитни антигени вероятно е необходим за проектиране на специфични формулировки на ваксината.

Диагностични методи за идентифициране, изолиране и охарактеризиране на вируса на АЧС

Окончателната диагноза на африканската чума по свинете (ASF) се основава на резултатите от лабораторните тестове, данните от стопанствата или полето и информацията относно епидемиологичната обстановка. **Лабораторните изследвания са важни за потвърждаване на диагнозата, тъй като клиничните признаци на заболяването, както и патологичните лезии могат да бъдат подобни на други хеморагични заболявания** при свинете, като класическа чума по свинете (КЧС), еризипела (червен вятър) и септицемия (*MacLachlan Dubovi 2017; Sánchez-Vizcaino et al., 2019*). Тъй като клиничната проява на АЧС може да варира значително, особено в случай

на субакутна или хронична форма на заболяването, АЧС не може да бъде диагностицирана само въз основа на клинични признаци или патологични находки.

Понастоящем контролът и ликвидирането на АЧС е изключително предизвикателство, тъй като нито ваксината, нито лечението са ефективни (*Dixon et al., 2020*). За да се предотврати разпространението на вируса в стадата домашни свине или популациите от диви свине, **ранното откриване и бързото обявяване на болестта са от решаващо значение**. Те обаче трябва да се прилагат в съчетание със строги санитарни мерки, а в ЕС — съобразно политика за унищожаване на стадата болни свине, съгласно Директива 2002/60/ЕО на Съвета.

Различни точни и международно признати лабораторни тестове, включително напълно валидирани търговски китове, са на разположение за диагностициране на АЧС (*Arias et al., 2018; Gallardo et al., 2015*).

Наличието на **надеждни и точни диагностични изследвания е предпоставка за ефективен контрол на заболяванията**, тъй като всяко клинично съмнение за АЧС при домашни свине и диви свине трябва да бъде проверено чрез лабораторни диагностични методи. На международно равнище лабораторните методи, както и насоките за вземане на проби могат да бъдат намерени в Ръководството на Световната организация за здравеопазване на животните (ОИЕ) за диагностични тестове и ваксини за сухоземни животни (глава 3.8.1, издание от 2019 г.) и в съответния наръчник на ЕС по диагностика (Решение на ЕК 2003/422/ЕО). Изборът на това кой тест да се използва зависи от наличните матрици, от целта на изследването (наблюдение, ликвидиране, диагностика, потвърждение), както и от епидемиологичния статус на страната (региона) или етапа на епидемията в региона.

Поради високата устойчивост на вируса на АЧС (ASFV) в околната среда и в продукти от свинско месо е установена необходимост от методи за откриване на вируса в алтернативни проби. Всъщност предаването чрез сурово месо и преработени продукти от свинско месо се счита за един от най-важните и вероятни начини за разпространение на ASFV, както е доказано на практика чрез трансгранично и трансконтинентално разпространение на инфекцията. Навлизането на африкански генотип II на ASFV в Грузия през 2007 г. е ярък пример за способността на вируса да прескочи на голямо разстояние. Смята се, че хранителните отпадъци, съдържащи заразено свинско месо от черноморското пристанище Poti, са източник на вируса в този случай (*Rowlands et al., 2009*). По-късно, след проникването на ASFV в азиатските държави, вирусът е открит в продукти от свинско месо, конфискувани от пътници на летища в държави, свободни от АЧС, като Япония, Тайван, Южна Корея, Австралия, Обединеното кралство и др. Обикновено такива продукти се тестват чрез полимеразна верижна реакция (PCR), което не дава информация за вирусната инфекциозност (*Kim et al., 2019; Wang et al., 2019*).

Събиране на проби

Отправната точка за всяко лабораторно изследване на АЧС е събирането на проби. Важно съображение е целта на изследването, например диагностика на болестта, наблюдение на болестта или здравно сертифициране. От кои животни да се вземат проби

зависи от целта на вземането на проби. Например, когато се изследва огнище (пасивен надзор), болните и мъртвите животни следва да бъдат целеви, докато от най-старите животни следва да се вземат проби при проверка дали животните са били изложени на болестта (активен надзор) (*Beltrán-Alcrudo et al., 2017*). **За да бъде ефективен надзора, подходящите проби, съчетани с избора на диагностични методи, са от основно значение, за да се постави бърза и надеждна диагноза.** Пробите, взети от живи свине, следва да включват цяла кръв с антикоагулант за откриване на вирус или вирусна нуклеинова киселина и серум за откриване на антитела, докато пробите, взети от умрели животни, следва да включват тъкани, както за откриване на вируса, така и за откриване на антитела.

Независимо от диагностичната цел, поради устойчивостта на ASFV, с пробите трябва да се борави по безопасен начин, за да се предотврати по-нататъшно замърсяване на околната среда, независимо от произхода им.

Кръв

Ако не е възможно да се вземе кръв от живи животни, вземането на проби от цяла кръв от трупове трябва да се извърши веднага след клането. Минимум 1 ml кръв трябва да се вземе от сърцето или вените, за предпочитане с EDTA във вакутейнерите като антикоагулант. (*Beltrán-Alcrudo et al., 2017 г.; OIE, 2019*).

При вземане на проби в отдалечени райони при лоши технически условия може да се използва техника за вземане на проби DBS (*dried blood spot sampling*). Няколко капки кръв се нанасят върху специална адсорбираща *Whatman 903* филтърна хартия (за откриване на ДНК и антитела) или FTA карта (само за откриване на нуклеинови киселини). Пробите, взети чрез DBS техника, могат да се съхраняват при стайна температура до 2 месеца (*Beltrán-Alcrudo et al., 2017; Majumdar et al., 2011; Randriamparany et al., 2016*).

Изсушени кръвни тампони също могат да се използват като бърза и проста техника за вземане на проби. Натривките, след като изсъхнат, могат да се съхраняват при стайна температура до 2 месеца. Получените проби могат да се използват както за откриване на генома на вируса, така и за откриване на антитела. Въпреки че чувствителността на тестовете за откриване на генома и антитела с помощта на проби, взети по такъв начин, е малко по-ниска от тази на конвенционалните цели кръвни проби, тази техника е много удобна и полезна, особено ако вземането на проби се извършва от непрофесионалист (ловци, техници и т.н.) (*Carlson et al., 2017*).

Серум

За получаване на серум се използва цяла кръв, взета от югуларната вена или аурикуларната вена от живи животни или непосредствено след евтаназията/клането. Минималното необходимо количество е 1 ml. Кръвта, събрана без антикоагуланти, трябва да се остави през нощта при $4 \pm 3^{\circ}\text{C}$. След отстраняване на съсирека серумът трябва да се центрофугира в продължение на 10-15 минути, за да се разделят клетъчните компоненти. Полученият серум трябва да бъде бистър; червеният цвят показва, че

пробата е хемолизирала, което може да доведе до фалшиво-положителен резултат на ELISA теста (*Beltrán-Alcrudo et al., 2017; OIE, 2019*).

Органи и тъкани

Целевите органи са далак, лимфни възли, сливици, сърце, бял дроб, черен дроб и бъбрек. От тях далакът, сливиците и лимфните възли са най-важните, тъй като обикновено съдържат най-големи количества вирус, докато черният дроб и бъбреците съдържат PCR инхибитори. Костният мозък или ставите също са полезен материал при пътни инциденти с диви животни, тъй като може да е единствената налична тъкан. Тъканните проби са полезни и за серологични изследвания (*Gallardo et al., 2019*). Минималното препоръчително количество събрана тъкан трябва да бъде около 5 g. Пробите трябва да се съхраняват при 4°C по време на транспортиране. (*Beltrán-Alcrudo et al., 2017; Carlson et al., 2017; OIE, 2019*).

Фекалии

Оптималното количество фекалии е около 50 g, в зависимост от анализа, използван за по-нататъшно тестване. Фекалният материал трябва да се постави в стерилен пластмасов контейнер, като се използва чиста и суха събирателна лъжичка (*Gaur et al., 2017*). Изпражненията могат да бъдат събрани директно от ректума с тампони. Тампон пробите се съхраняват и транспортират в контейнери със стерилен PBS или транспортна среда. Фекалните проби следва да се транспортират при хладилни условия или върху лед и да се тестват възможно най-скоро (*OIE, 2019*). Фекалните проби обаче са **по-малко информативни** поради краткосрочната преживяемост на жизнеспособен ASFV (*Davies et al., 2017; De Carvalho Ferreira et al., 2014*). Анализът на фекални проби не се счита за достатъчно чувствителен за целите на надзора на АЧС.

Орални течности

Mouchantat et al. (2014 г.) показва възможност за използване на метод за вземане на проби от въже с примамка („pSWAB“) за събиране на слюнка от диви свине. За тази цел са използвани памучни въжета с диаметър 8 mm, с примамки на зърнена основа. След дъвчене на въжето мократа част на въжето се поставя в стерилна епруетка.

Почвени проби

За вземане на проби от почвата могат да се използват различни видове оборудване; въпреки това, лъжици и шпатули са най-подходящи, тъй като те могат лесно да бъдат стерилизирани. Около 50 g (мокро тегло) от почвата трябва да се събере в чиста и суха пластмасова центрофужна епруетка. Пробите трябва да се съхраняват в хладилник. Замразяването или използването на сух лед води до значителна загуба на вирусен генетичен материал от почвата (*Hurst and Reynolds, 2007*).

Храна/фураж

Изборът на техника за вземане на проби от фураж зависи от вида и количеството на материала, тъй като за тази цел могат да се използват различни специални инструменти. Специални сонди за зърно обикновено се използват за вземане на проби от насипни фуражи. Трябва да се вземат най-малко 10 проби от равномерно разпределени места.

Вода

Водата трябва да се събира в стерилни контейнери за проби. Могат да се вземат проби от езерна вода, резервоари, поилки и кладенци (*Herrman, 2001*).

Вземане на проби от повърхността

Тампони с памучен или полиестерен връх обикновено се използват за вземане на проби от замърсени повърхности. Вода, солени разтвори или различни транспортни среди могат да се използват като елуент в процеса на вземане на проби. Части от повърхността, които са окървавени или изцапани с фекалии следва да са предпочитани при вземане на проби. (*Julian et al., 2011*).

Изцапани с кръв материали

Проби от окървавени материали като почва и растения могат да бъдат взети за лабораторни изследвания. (*Gaur et al., 2017*).

Международно признати диагностични тестове за африканска чума по свинете

Тестове за откриване на вируса на африканска чума по свинете

Наличните и общовалидни тестове за откриване на нуклеинова киселина са чрез полимеразна верижна реакция в реално време (rPCR) или PCR с гел електрофореза, изолиране на вируса и HAD тестове или тестове за откриване на антигени, като например директен имуофлуоресцентен тест за антитела (DIF) върху фиксирани органни криосрезове и ELISA, откриващи p72 антигени (*OIE, 2019*). Освен това точковите тестове за откриване на антигени (*point of care tests for antigen detection*) са ценни инструменти, които трябва да се използват при полеви изпитвания, особено в ситуации, при които лабораторната инфраструктура и квалифицираният персонал са ограничени и в много случаи първите доказателства за заболяването се основават само на клинични симптоми. Изследването LFA (*Lateral flow assay*) за откриване на антигени осигурява бърз и лесен начин за идентифициране на инфекцията с ASFV на индивидуално ниво (*Sastre et al., 2016*).

За скрининг на голям брой животни антиген ELISA е бърз метод, който може да бъде напълно автоматизиран; въпреки това, неговата чувствителност е доста

ниска, особено защото качеството на пробата може да има значително въздействие върху окончателните резултати от изследването (*Gallardo et al., 2019; Oura et al., 2013*), поради което не се използва за изпитване на отделни животни. **Откриването на антигени чрез DIF** дава **бързи резултати** и е **високо чувствителен** тест за случаи на перакутна и остра форма на протичане на АЧС. Това е чувствителен и надежден тест, но до голяма степен е **заменен с PCR** и реагентите вече не са широко достъпни. Важно е да се отбележи, че при субакутни и хронични заболявания, където има антитела, чувствителността на този метод също е ограничена (40%) и тълкуването на резултатите от теста е трудно и изисква добре обучен и опитен лабораторен персонал (*Gallardo et al., 2019*).

Характерна особеност на инфектираните клетки с теренни изолати на ASFV е способността му да адсорбира свинските еритроцити (**хемадсорбция**) на повърхността си, образувайки еритроцитни розетки, което позволява изолиране на вируса (VI) и идентифициране чрез HAD тестове. Това свойство се използва за разграничаване на ASFV от други патогенни агенти, причиняващи заболявания със симптоми, подобни на АЧС, и се **препоръчва като референтен потвърдителен тест** в случай на първично огнище. На теория всички ASFV, събрани от естествени огнища, могат да бъдат изолирани в податливи първични свински левкоцитни култури или от кръвни или белодробни моноцити или от макрофаги. Въпреки това култивирането на изолати ASFV е критична стъпка в диагностиката в националните референтни лаборатории, много по-скъпо е от други техники, тъй като изисква както специализирани съоръжения, така и обучение, отнема време и не може да бъде адаптирано към висока производителност. В допълнение, **опитите за изолиране на инфекциозен вирус** от проби, получени на място, дават **неточни резултати**. Причината се крие в лошото състояние на получените проби, което засяга жизнеспособността на вируса, особено при проби, получени от мъртви или уловени животни, като например диви свине. Освен това, някои полеви щамове предизвикват само цитопатичен ефект (*Boinas et al., 2004; Gallardo et al., 2019a; Leitão et al., 2001*); тези вируси, които не са HAD, не се изолират лесно и изискват допълнително потвърждение, като се използва PCR или DIF тест (*Oura et al., 2013*). Въпреки тези ограничения, **изолирането на вируса е от съществено значение за получаване на вирусни запаси за по-нататъшни изследвания на молекулярнобиологично ниво**. Използването на установени клетъчни линии, като COS-1 (подобна на фибробласти, клетъчна линия), IPAM (клетки на алвеоларни макрофаги на свинете) или WSL (белодробни клетки), може да преодолее трудностите при получаването на първичните клетки. Тези клетъчни линии обаче не винаги са подходящи за изолиране на ASFV от полеви проби без предварително първично култивиране (*Carrascosa et al., 2011*). Поради това са необходими допълнителни проучвания за оценка за потенциалното използване на установени клетъчни линии при рутинната диагностика.

Detection	Available tests	Type: in house/commercial	Recommended use
Virus	genome detection	PCR (OIE TaqMan probe ¹ , OIE UPL probe ¹ or OIE conventional PCR ¹ , and commercial kits ²)	suspicion; surveillance; individual and herd testing
	virus isolation	VI/haemadsorption (HAD) test ¹ (i.h.)	confirmation of primary outbreak
	antigen detection	Direct Immuno fluorescence (DIF) ¹ (i.h.) Antigen ELISA commercial kit INgezim PPA DAS, Double Ab Sandwich	individual testing (acute forms) surveillance; herd testing (acute forms)
	pen-side test	Lateral flow assay (LFA) commercial kit (INgezim ASF CROM Ag)	herd testing (acute forms)
Antibody	ELISA	ELISA (OIE, commercial kits ³)	surveillance; herd testing
	confirmatory test	Immunoblot (IB) test ¹ (i.h.) Immunofluorescence Antibody (IFAT) test ¹ (i.h.) Indirect Immunoperoxidase test ¹ (IPT) (i.h.)	confirmatory; herd testing confirmatory; herd testing confirmatory; herd testing
	pen-side test	LFA commercial kit INgezim PPA CROM	herd testing

Методи за диагностика, одобрени и достъпни тестове, тип на изпитванията и препоръчана употреба

Сред изброените по-горе тестове **PCR е най-чувствителният метод за откриване на този патоген и следва да се разглежда като основен метод в лабораторната диагностика от първа линия.** Разработени са и са валидирани различни PCR тестове, включително конвенционални и в реално време (rPCR), за откриване на широк спектър от изолати на АЧС, принадлежащи към различни известни вирусни генотипове, щамове, които не са HAD, и изолати с разнообразна вирулентност (Gallardo et al., 2019; OIE, 2019; Oura et al., 2013). Всички те са **насочени към кодиращия регион в генома P72, отговорен за високата заразност и контагиозност на щамовете, ген, кодиращ основния вирусен протеин, гарантиращ (потенциално) откриване на всеки изолат ASFV.** rPCR на OIE, разработен от King et al. (2003; OIE, 2019) и *Universal probe library* на OIE (UPL), разработена от Fernández-Pinero et al. са най-широко използвани за рутинна диагностика на международно ниво. И двата метода са в състояние да осигурят **надеждна диагноза на АЧС**, въпреки че този на UPL-PCR има по-голяма диагностична чувствителност за откриване на вирус при животни с нисък вирусен товар. rPCR е разработен от Tignon et al. (2011) и включва вътрешна контрола, също е добре пригоден за диагностични цели. И накрая, броят на търговските китове за откриване на геномни участъци на ASFV въз основа на публикувани rPCR значително се е увеличил през последните години. Те представляват **алтернатива, която може да гарантира определена хомогенност на резултатите, което е от първостепенно значение за стандартизацията и възпроизводимостта на резултатите сред лабораториите.** По същите причини **всеки нов търговски анализ на АЧС трябва да бъде оценяван и валидиран съгласно международни критерии**, за да се гарантира, че той е специфичен, чувствителен, възпроизводим, прецизен, надежден и точен. В обобщение, **PCR вече е установен като златен стандартен метод за откриване на вируси и се използва като основен диагностичен инструмент както за пасивен, така и за активен надзор**, като се има предвид дългосрочната времевия и високото вирусно натоварване при заразените животни, имащи остри или субакутни клинични прояви. Той

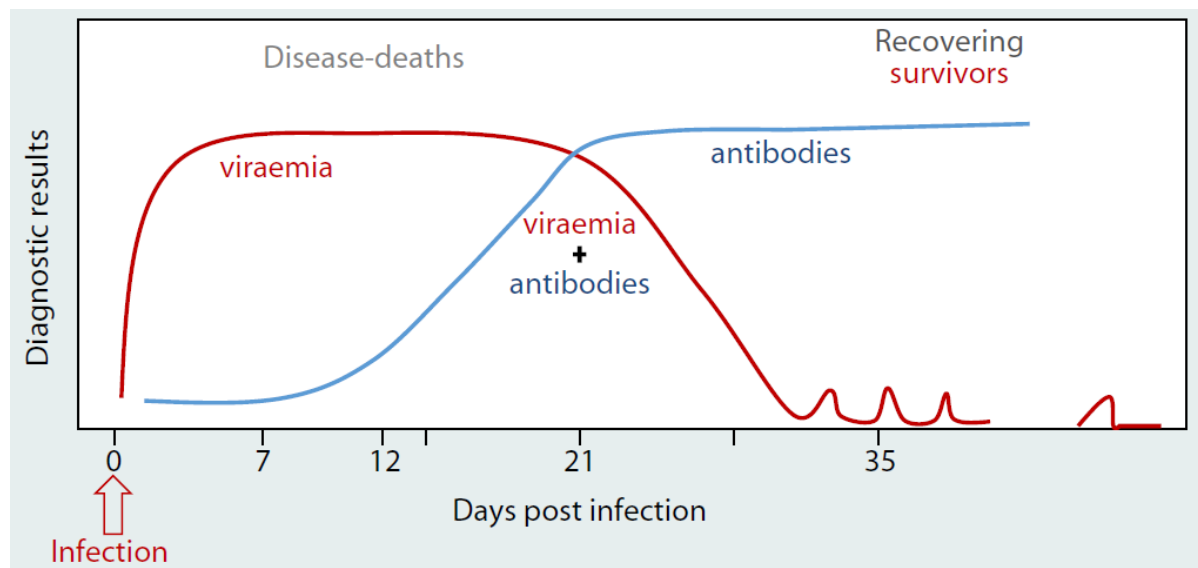
е бърз и може да се използва както за индивидуални, така и за полирани проби, въпреки че за последните има доста ограничения (*Gallardo et al., 2019*).

Тестове за откриване на антитела към африканска чума по свинете

При всяко съмнение, че ASFV циркулира в популация от свине, за диагностицирането на заболяването трябва да се използват и серологични изследвания. Освен това **серологията следва да се прилага за целите на надзора, тъй като е ценен инструмент за по-нататъшни епидемиологични изследвания**, например за определяне на момента на постъпване на патогена в стадото свине или в популация от диви свине. Анти-ASFV антитела се появяват скоро след инфекцията и продължават до няколко месеца или дори години (*Arias et al., 2018; Penrith et al., 2004, Schulz et al., 2020*). Освен това, докато няма ваксина срещу ASFV, наличието на анти-ASFV антитела винаги показва инфекция. Следователно надзорът, основан на антитела, е от съществено значение за откриването на оцелели животни, за изясняване на епидемиологичните характеристики на епидемиите, т.е. времето след постъпване на вируса в стопанството, и за откриване на циркулиращи ниско патогенни изолати на ASFV (*Beltrán-Alcrudo et al., 2017, Sánchez-Cordón et al., 2018*). Серопреваленса може да се използва за доказване на статут „свободен от болест“ в дадена държава, при условие че се комбинира с активен или пасивен надзор въз основа на откриване на геном на вируса. Наскоро мултиплекс тест за откриване на антитела, използвайки *Luminex* и включващ различни целеви антигени както на ASFV, така и на CSFV, показва повишена чувствителност на изследването в сравнение с отделните ELISA, използвани като референтни (*Aira et al., 2019*). Това може да е от особен интерес при анализа на полеви проби, където животните могат да реагират по различен начин на вирусната експозиция и да представят различни нива на антитела към всеки от вирусните протеини.

Настоящите препоръки на ЕС (2003/422/ЕО) и ОИЕ (2019 г.) за откриване на антитела срещу ASFV включват използването на ELISA за скрининг на антитела, подкрепен от имуноблотинг (IB), индиректен имуофлуоресцентен тест (IFAT) или индиректни имуопероксидазни тестове (IPT) като потвърждаващи тестове (ОИЕ, 2019). Съществуват редица валидирани ELISA тестове за откриване на антитела срещу ASFV, включително няколко вариации на теста (ОИЕ) въз основа на използването на жив вирус като антиген, рекомбинантни ELISA (*Cubillos et al., 2013*) и готови търговски китове за ELISA. **ELISA остава най-полезният метод за широкомащабни серологични изследвания: тя е бърза, лесна за изпълнение и икономична.** Поради тези причини ОИЕ препоръчва за серология ELISA. Въпреки това, **може да се анализира само серум, което ограничава обхвата на приложение**, особено в случай на пасивно наблюдение при диви свине, когато животните обикновено се намират мъртви. Освен това хемолизираните серумни проби могат да дадат **фалшиво положителни или отрицателни резултати** в зависимост от използвания ELISA тест. Поради това положителните резултати от ELISA следва винаги да се потвърждават чрез допълнителни методи, като например IPT, IFAT или IB тестове, както се препоръчва от ОИЕ (2019). IB е бърз и чувствителен анализ, но подобно на описаното по-горе, могат да бъдат тествани само серумни проби. За сметка на това, IPT или IFAT могат лесно да се

използват за анализ на всички видове проби от свине, включително тъканни ексудати, цяла кръв и дори костен мозък. Тези тестове имат висока специфичност и чувствителност, но тълкуването на резултатите може да бъде субективно и се изисква добре обучен персонал. Поради това би било важно да се разработят и валидират стандартизирани ELISA за откриване на специфични антитела срещу ASFV за лесна и по-надеждна оценка на епидемиологичната обстановка в засегнатите области.



Диагностични тестове за африканска чума по свинете на първа линия

Когато се изследват огнища на болести при животните, колкото по-рано клиничните признаци на болестта са признати от земеделския стопанин и колкото по-рано клиничната диагноза бъде потвърдена чрез лабораторни тестове, заедно с бързо докладване на отговорните ветеринарни органи, толкова по-добре ще бъде контролирана болестта. Успехът отчасти зависи от изпращането на проби в референтна лаборатория за изследване на наличието на ASFV или антитела срещу него. Наличието на диагностични тестове на «първа линия» би имало предимството да предостави допълнителна подкрепа за клиничната оценка на първо място и може да намали времето, необходимо за потвърждаване на резултатите от теста във вторични случаи на заболяването. Следователно използването на бързи диагностични тестове, които могат да се провеждат на място, където се намират заразените животински популации, би улеснило по-ранния и по-ефективен контрол на болестите.

Молекулярните технологии като rPCR анализите може да не са налични в региони, бедни на ресурси, тъй като те изискват специализирани лаборатории, обучен персонал и скъпи реагенти. Няколко предизвикателства са свързани с извършването на PCR на място, особено: необходимостта от преносим термосайклер, центрофуга, които включват извършване на екстракция на нуклеинова киселина; защита на пробите от кръстосано замърсяване и поддържане на хладилни условия за реагентите и пробите. Изотермичната амплификация (**LAMP - Loop-mediated isothermal amplification**) може да бъде **по-евтина диагностична алтернатива на PCR** и да бъде

полезна в полеви условия. Чувствителността му е подходяща в случаите, когато са налице клинични признаци и е достатъчна за откриване на остри инфекции. Въпреки това, LAMP все още **няма насъбрани достатъчно данни от изпитвания** за валидиране на този метод **за полеви условия** и **не се препоръчва** в случаи на ниско съдържание на ASFV геном поради значително по-ниска чувствителност в сравнение с PCR както при конвенционалния, така и при този в реално време (*Oura et al., 2013*).

Алтернатива е използването на *pen-side tests*, които предлагат диагностика от първа линия за **бързо приложение** в случай на санитарни спешни случаи. Този вид изпитване е особено полезно в полеви условия, където няма оборудване, тъй като изпълнението на теста и интерпретацията на резултатите са прости. LFA за откриване на антигени (*INgezim ASF CROM Ag*), описани от *Sastre et al. (2016)* се основава на използването на моноклонално антитяло срещу P72 протеин на ASFV и осигурява чувствителност, подобна на тази на търговския антиген-ELISA кит, когато се изследват проби от експериментални инфекции. Доказано е, че **LFA позитивира** при животни с циркулиращи **вирусни нива над 10^4 хемосорбционни единици**. При тестване на полеви проби, LFA показва **60% чувствителност спрямо 48% от антиген-ELISA**, въпреки че показва по-ниска чувствителност в сравнение с rPCR. LFA за откриване на антитела (*INgezim PPA CROM*) при полеви условия при диви свине в Сардиния (*Cappai et al., 2017*) показва чувствителност от 82% и специфичност от 96% в сравнение с търговската антитяло-INGENASA ELISA и IPT. И накрая, разработени са мултиплексни тестове за откриване на антитела, специфични за АЧС, и за класическа чума по свинете, което улеснява надзора и за двете болести в областта (*Sastre et al., 2016*). Важно е да се отбележи, че **LFA не е ефективен метод за откриване на остри форми на заболяването**. Освен това този метод следва да **не се използва самостоятелно поради много ниската чувствителност** в сравнение със златните стандартни методи (*Gallardo et al., 2019*). Резултатите трябва да бъдат потвърдени чрез техники за откриване на вирусен геном/антигени, тъй като антителата не могат да бъдат открити преди 12-14 ден след инфекцията, като се използват тези тестове.

В обобщение, **чувствителността на теста трябва да бъде висока, докато специфичността е по-малко критична** величина, тъй като всеки положителен резултат ще трябва да бъде потвърден от компетентната национална референтна лаборатория.

Взети заедно, са налични чувствителни, специфични и солидни лабораторни диагностични изследвания, но както при всяко друго заболяване, **няма нито един тест, който да е 100% надежден** (чувствителен и специфичен). Поради тази причина **окончателната диагноза следва да се основава на тълкуването на резултатите, получени от използването на подходящи проби и валидирани тестове в комбинация с информацията, получена от епидемиологията на заболяването, и клиничните признаци**. Задълбоченото разбиране на времевия ход на вирусите и сероконверсията на антителата по време на инфекцията с ASFV е предпоставка за получаване на съответната информация за динамиката на инфекцията в изследваните области и за подпомагане на програмите за контрол и ликвидиране. Следователно подходящата диагноза следва винаги да включва откриването и идентифицирането на специфични антигени на ASFV или ДНК и антитела.

В свободните зони, граничещи със заразени територии, следва да се предприемат мерки за засилване на пасивния надзор и тестването чрез молекулярни методи, пропорционално на резултатите от оценката на риска. В остри фази на заболяването ASFV лесно се открива във всякакъв вид проби от свине чрез rPCR, VI и дори с помощта на техниките за откриване на антигени (DIF или ELISA). Въпреки това, макар и редки, могат да се появят фалшиво положителни PCR резултати (например поради лабораторно замърсяване или други фактори) и поради това първичното огнище на АЧС следва да бъде потвърдено чрез изолиране на ASF и HAD изследване. Това обаче невинаги може да е възможно поради времеви или технически ограничения и намалена чувствителност, особено при проби, получени от умрели диви свине, или при слабо положителни проби от PCR. Ако HAD не е възможно, резултатите от PCR трябва да бъдат потвърдени чрез изследване на патологията и най-малко два отделни теста за откриване на вируси, вирусен геном или антитела.

Важно е да се отбележи, че тъй като животните обикновено развиват антитела през втората седмица след инфекцията, е възможно животните да са положителни както за ASFV, така и за антитела едновременно в продължение на най-малко два месеца. Пробите от животни, оцелели след този период, обикновено са положителни за ASFV-специфични антитела, но отрицателни за ASFV и неговия геном. Освен това животните, заразени с атенюирани щамове сероконвертират след първата седмица на инфекцията дори при липса на клинични признаци или вiremия. Положителните резултати както за вируса, така и за антителата показват, че тестваното животно е било заразено по време на вземането на проби, докато положителният тест за антитела към ASFV при липса на вирус показва продължаваща или минала инфекция, при която животното се е възстановило или може да бъде хронично или субклинично заразено с атенюирани щамове.

Откриване на вируса на африканската чума по свинете в сурови и преработени продукти от свинско месо

ASFV е силно устойчив на различни температури и рН условия, особено в богатата на протеини среда, като месо, кръв, органи и преработени свински продукти. Така, в тези матрици, вирусът остава жизнеспособен в продължение на месеци и дори години (в охладено сурово месо - 110 дни, в замразено месо - до 1000 дни, в свинска мас в продължение на 300 дни, в кръв в продължение на 18 месеца). Времето на оцеляване на ASFV в преработените продукти от свине варира значително в зависимост от продукта и процеса на преработка. *Mebus et al. (1993, 1997г.)* показва, че ASFV остава жизнеспособен за период до 140 дни в традиционни продукти от сухо сушено свинско месо, като шунка, филе и др. Търговското време за консервиране на тези видове месни продукти обаче е по-дълго от периода на вирусна жизнеспособност, което означава, че вирусът ще бъде инактивиран до края на преработката. *Petrini et al., 2019* обаче установява, че пробите от свински колбаси и сурово-сушени такива са положителни съответно между 60 и 80 до 137 дни, което е повече от общото време на обработка и срок на годност на тези видове продукти. Консервираното месо, което е било изложено на висока температура по време на преработката, не съдържа нито вирус, нито вирусен

геном. Следователно рискът от разпространение на ASFV със сурово месо и преработени продукти от свинско месо зависи от преработката. Топлинно обработените продукти, като консервирано месо, могат да се считат за безопасни, тъй като вирусът се инактивира от температура, по-висока от 60°C (20 минути експозиция). Въпреки това, осолените или сушените свински продукти крият известен риск от разпространение. Въпреки че има много проучвания относно преживяемостта на ASFV в свинското месо, екстраполирането на тези данни за оценка на риска едва ли е възможно, тъй като варира значително в зависимост от продължителността и вида на преработката и използваната матрица (Petrini et al., 2019).

За откриване на ASFV в сурови и преработени продукти от свине могат да се използват различни методи в зависимост от целта на теста. **PCR е най-широко използваният диагностичен инструмент за откриване на вирусен геном**, тъй като е бърз, специфичен, способен да открива всички известни генотипове и **може да се използва за тестване на различни проби, включително тези, в които вирусът може да бъде инактивиран**. ОИЕ препоръчва няколко основани на PCR изследвания, включително конвенционални PCR и PCR в реално време (ОИЕ, 2019 г.). Тези анализи обикновено се използват **за изпитване на вносни или конфискувани месни продукти** (Kim et al., 2019; Wang et al., 2019). Въпреки това, **PCR техниката не може да докаже наличието на цял инфекциозен вирус в пробата, което ограничава използването му**. LAMP е допълнителна техника, която може да се използва за откриване на геном на ASFV. Предимството на метода е, че той използва ДНК-полимераза (обикновено Bst), която може да се извършва при постоянна температура с просто и евтино оборудване. Изобилието от цикли позволява генерирането на откриваеми количества от целевата ДНК за 20-30 минути. Продуктите от LAMP могат да бъдат визуализирани директно в реакционната смес чрез добавяне на багрило и излагане на UV светлина или чрез конвенционална гел електрофореза (James et al., 2010; Wang et al., 2020). Въпреки че LAMP все още не е използван за откриване на ASFV ДНК в месни продукти, техниката се прилага широко в микробиологичната оценка на качеството на различни месни продукти. Досега патогени като *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus suis*, *Salmonella* spp. и други могат да бъдат открити в свинско месо с помощта на LAMP (Kumar et al., 2017), което прави рутинното прилагане на метода за откриване на ASFV в тези проби обещаващо.

Откриването на вирусен геном обаче, било то чрез PCR или LAMP, не дава информация за инфекциозността на вируса и следователно за риска от по-нататъшно замърсяване. Изолирането на вируса въз основа на теста за HAD е най-широко използваното за установяване наличието на жизнеспособна ASFV, въпреки че е трудоемко и отнема много време. Биоанализ (или *in vivo* анализ) е много по-малко използвана техника за откриване на инфекциозни вирусни частици. Подходът се състои в прилагане на хомогенат от изследваните проби на здрави свине по орален, оронозен път или чрез интрадермално инжектиране. Ако свинете се разболеят, получените от тях проби се използват за по-нататъшно изследване чрез изолиране на вируса, PCR, серологични тестове и т.н. Биоанализ следва да се разглежда само в случай на невъзможност за изолиране на вируса или за гарантиране на отрицателни резултати от изолирането на вируса (Mebus et al., 1993, 1997; Petrini et al., 2019).

Една иновативна техника за охарактеризиране на целия геном или определени локуси от вирусния геном е пълния геномен секвентен анализ. Тази техника предоставя бързо разчитане на геномната последователност на вируса, биоинформатичен анализ на пълната геномна секвенция и клъстериране или таксономично определяне на конкретни изолати. Тези нови технологии предоставят точна, навременна, високо чувствителна и специфична експертиза за конкретни вирусни, бактериални или гъбични геноми, като дава яснота относно вирулентността, циркулацията и разпространението на, в случая, ASFV сред различните видове гостоприемници.

Секвениране на целия геном на ASFV посредством NGT

Геномът на ASFV варира по размер между 170 и 194 килобази (kbp) със запазена консервативна област от около 125 kbp, в допълнение към лявата вариабилна област (LVR) от 38 до 47 kbp и дясната вариабилна област (RVR) от 13 до 16 kbp (*de Villiers et al. 2010*). Изменението на дължините на генома на различните щамове на ASFV се дължи на присъствието или отсъствието на членове на петте различни мултигенни семейства (MGF) на ASFV, открити в LVR и RVR, например MGF 100, 110, 300, 360 и 530/505 (*Alonso et al. 2018*). Предварителни проучвания са докладвали между **151 и 167 ORF (отворени рамки на четене) в генома на ASFV**. Все по-голям брой проучвания обаче съобщават за повече от 167 ORF в генома на ASFV, особено щамове, принадлежащи към ASFV p72 генотип II, включително седем диви изолата, събрани между 2016 и 2017 г. с 187 до 190 ORF (*Mazur-Panasiuk et al. 2019*) и ASFV щам Belgium/Etalle/wb/2018, открит при диви свине в Белгия през 2018 г. със 186 ORF (*Gilliaux et al. 2019*).

Проучване на тема: „*Complete genome analysis of African swine fever virus responsible for outbreaks in domestic pigs in 2018 in Burundi and 2019 in Malawi*“ на *Jean N. Hakizimana, Jean B. Ntirandekura, Clara Yona, Lionel Nyabongo, Gladson Kamwendo, Julius L. C. Chulu, Désiré Ntakirutimana, Olivier Kamana, Hans Nauwynck, Gerald Misinzo*, което анализира 12 пълни генома на ASFV щамове, събрани в Сардиния, Италия, от 1978 до 2014 г. докладва 231 ORF в четири изолата и 235 ORF в осем изолати на ASFV с 66 ORF, определени като нехарактеризирани (*Torresi et al. 2020*).

Въз основа на частичен нуклеотиден анализ на секвенцията на гена B646L, който кодира основния капсиден протеин p72, 24 (I-XXIV) генотипове на ASFV са идентифицирани и всички те циркулират в Африка, Южна Сахара (*Achenbach et al. 2017; Lubisi et al. 2007; Quembo et al. 2018*). Предишни проучвания съобщават за ASFV p72 генотипове II, V, VIII и XII в Малави, докато само ASFV p72 генотип X е докладван в Бурунди (*Hakizimana et al. 2020; Lubisi et al. 2005*). Понастоящем само 3 пълни и напълно анотирани ASFV щамове, принадлежащи към p72 генотип X, са налични в GenBank, включително два щамове от Кения и един от Демократична република Конго (DRC) (*Bisimwa et al. 2021; de Villiers et al. 2010*). В допълнение няма щам ASFV p72 генотип II от Малави, който е бил подложен на пълно секвениране на генома. В това проучване са докладвани пълните геномни последователности на ASFV p72 генотип X

(BUR/18/Rutana), отговорни за избухването на АЧС през 2018 г. в Бурунди и ASFV 72 генотип II (MAL/19/Karonga), които са причинили огнище през 2019 г. в Малави.

Събирането на пробите, използвани в това изследване, и последващото потвърждаване и генотипа на АЧС са описани от *Hakizimana et al. 2020*. Вирусната ДНК е екстрахирана от тъканни проби с помощта на *Quick-DNA Ω Miniprep Plus Kit*, следвайки инструкциите на производителя. Оценката на целостта и качеството на екстрахираната ДНК се извършва чрез 1% агаргел електрофореза. Стартовата първична геномна ДНК за пълно секвениране е оценена количествено по метода *PicoGreen (Invitrogen)*, използвайки флуорометрията *Victor 3 (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Shelton, USA)*. Illumina NovaSeq6000 инструмент с конфигурация 2 × 150 bp се използва за секвениране и *TruSeq Nano DNA Kit* е използван за подготовка на библиотеки, според протокол на производителя. Контролът на качеството на подготвената библиотека е извършен от 2100 Bioanalyzer, а количествена оценка е извършена с помощта на полимеразна верижна реакция в реално време (qPCR) съгласно Illumina qPCR *Quantification Protocol Guide*. Библиотеките са били подложени на секвениране, за да произведат приблизително 28 милиона сдвоени четения (4 GB) на проба.

Отстраняване на адаптерните последователности и четенията с ниско качество е извършено с *Trim Galore версия 0.6.4*, като границата на четене е зададена на 30 с минимална дължина на секвенциите от 75 нуклеотида. Качеството на данните от обработената последователност е оценено с FastQC версия 0.11.9. Качествените секвенции са подложени на *de novo* асемблиране с помощта на *SPAdes версия 3.13.1* и *Megahit версия 1.2.9*. Контигите са картографирани към референтния геном с помощта на *Burrows-Wheeler Aligner (BWA)* с опция за максимално точно съвпадение (*mem*) и *QUAST* е използвана за оценка на качеството на асемблирания геном. Най-дългите припокриващи се секвенции са сглобени, за да се генерират пълните геноми на ASFV. Софтуерът *Genome Annotation Transfer Utility (GATU)* е използван за анотация на сглобените геноми на ASFV, използващи Georgia 2007/1 (GenBank номер на присъединяване NC_044959.2) и Ken05/Tk1 (номер на присъединяване на GenBank NC_044945.1) като референтни геноми. Основният инструмент за търсене на локално подравняване за нуклеотид (BLASTN) версия 2.11.0 + (*Zhang et al. 2000*) е използван за подравняване на нуклеотидните последователности и търсене на нуклеотидна идентичност в базата данни на GenBank. Окончателното подравняване на последователността е извършено с помощта на програма *MAFFT* и еволюционната взаимовръзка между изолатите и референтните секвенирани геноми е изведена с помощта на *Kimura 2* модел както се прилага в *MEGA X (Kumar et al. 2018)*.

В това проучване са определени пълни геномни последователности на щамове на ASFV, отговорни за огнището през 2018 г. в регион *Rutana*, Югоизточен Бурунди (BUR/18/Rutana) и огнището от 2019 г. в област *Karonga*, северен Малави (MAL/19/Karonga). Щамове BUR/18/Rutana и MAL/19/Karonga принадлежат съответно към генотипове X и II на ASFV p72, както е описано по-рано чрез амплификация на генома и секвениране, насочени към специфични геномни региони (*Hakizimana et al. 2020*). Съдържанието на GC в секвенираните геноми от 176 564 bp за BUR/18/Rutana и 183,325 bp за MAL/19/Karonga са съответно 38,62 и 38,48%. Щамът MAL/19/Karonga има общо 186 отворени рамки за четене (ORFs), докато щамът

BUR/18/Rutana има 151 ORF, както се подчертава от уеднаквяването на хомоложните гени в целия геном между щамовете на ASFV, описани в настоящото проучване, и съответните референтни геноми. За MAL/19/Karonga са идентифицирани общо 44 членове на мултигени семейства (MGF) в рамките на генома, включително MGF 100 (3 членове), MGF 110 (10 членове), MGF 300 (3 членове), MGF 360 (18 членове) и MGF 505 (10 членове). Освен това 36 членове на MGF са идентифицирани в генома на щамата BUR/18/Rutana, включително MGF 100 (1 член), MGF 110 (8 членове), MGF 300 (3 членове на ЕП), 360 MGF (16 членове) и MGF 505 (8 членове).

Използвайки пълни геномни последователности за търсене чрез BLASTN в GenBank, вирусът MAL/19/Karonga е тясно свързан с изолат Tanzania/Rukwa/2017/1 (GenBank номер на присъединяване LR813622) ASFV, от Югозападна Танзания - изолат от заразено домашно прасе през 2017 г. и принадлежащ към ASFV p72 генотип II, с 99,97 % нуклеотидна идентичност. **Процентът на нуклеотидната идентичност е по-голям от 99% с други пълни геномни последователности на ASFV, принадлежащи към p72 генотип II, изолирани в Европа и Азия, включително изолата на Грузия 2007/1.** От друга страна, щамът BUR/18/Rutana ASFV показва 99,34%, 99,08% и 98,95% нуклеотидна идентичност с Uvira B53 (*Bisimwa et al. 2021*), Ken05/Tk1 (*Bishop et al. 2015*) и Кения 1950 г. (съответно щамове за присъединяване към GenBank AY261360) ASFV p72 генотип X. Филогенетичното дърво на база пълен геномен секвентен анализ групира вирусите MAL/19/Karonga и BUR/18/Rutana в ASFV генотипове II и X, съответно. С размер на генома 183,325 bp щамът MAL/19/Karonga е 139 bp по-дълъг от Tanzania/Rukwa/2017/1 (183,186 bp) и около 6 до 7 kbp по-къс от някои изолати на ASFV p72 генотип II, налични в GenBank Nucleotide data base, например Georgia 2007/1 (190,584 bp), Arm/07/CBM/c2 (190,145 bp) и ASFV-wbBS01 (189,394 bp). Освен това щамът BUR/18/Rutana с дължина на генома 176 564 bp е с около 4 до 17 kbp по-къс от Uvira B53 (180 916 bp), Ken05/Tk1 (191,058 bp) и Кения 1950 (193,886 bp) ASFV p72 генотип X геноми. Разликата в дължината на генома се дължи на разликите в някои гени и MGF членове. Например, от 186 ORF, идентифицирани в MAL/19/Karonga, 151 ORF имат 100 % нуклеотидна идентичност с техните хомолози в референтния геном, докато останалите 35 ORF са полиморфни с нуклеотидна идентичност, като референтният геном варира от 60 до 99,9 %. Освен това четири ORF (MGF 360-1Lb, ASFV G ACD 00, 120, MGF 110-7L и MGF 110-10-L-MGF110-14L), налични в референтния геном на ASFV, са под прага на нуклеотидна идентичност от 60 % и се счита, че липсват във вируса MAL/19/Karonga. От 151 ORF, идентифицирани във вируса BUR/18/Rutana, само 35 ORF са имали 100% нуклеотидна идентичност с техните хомолози в референтния геном Ken05/Tk1, докато останалите са имали между 60 и 99,9 % идентичност. Освен това 10 членове на MGF (MGF 110-7L, MGF 110-8L, MGF 100-1R, MGF 110-9L, MGF 110-11L (FRAG-2), MGF 110-13L-14L, MGF 360-12L, MGF 360-15R, MGF 100-3L, MGF 360-18R), присъстващи в референтния геном Ken05/Tk1, имат нуклеотидно сходство под 60 % в сравнение с техните хомолози при вируса BUR/18/Rutana.

За да се класифицират щамовете на ASFV, описани в това проучване, сред осемте предварително определени серогрупи въз основа на хемадсорбцията на ASFV (HAI), в това проучване са сравнени последователностите на гена EP402R, който кодира CD2v основния ASFV антигенен протеин между тях и избрани изолати, представляващи всяка

серогрупа, извлечена от GenBank. Наблюдава се висока вариабилност на нуклеотидната последователност сред сравняваните последователности и резултатите от серотипирането класифицират BUR/18/Rutana и MAL/19/Karonga ASFV вируси съответно в серогрупи 7 и 8. Burundian ASFV щам, групиран заедно с два щам, принадлежащи към серогрупа 7, описани по-горе, например щамът Uvira B53 ASFV, събран по време на огнище на АЧС в провинция Южно Киву на Демократична република Конго (ДПК) през 2019 г., и щамата Uganda ASFV (Bisimwa et al. 2021; Malogolovkin et al. 2015), докато **щамът MAL/19/Karonga ASFV се групира заедно с щамове, принадлежащи към серогрупа 8 на ASFV, описана по-рано в Европа и Азия.**

Ограничените познания за генетичната вариация на ASFV възпрепятстват разработването на ефективни стратегии за контрол и превенция, включително ваксини, диагностични тестове и развитие на антивирусно лечение (Arabyan et al. 2019; Torresi et al. 2020; Urbano et al. 2021). Частичното нуклеотидно секвениране на специфични геномни региони на ASFV се използва конвенционално за определяне на генотиповете на ASFV и за разграничаване на тясно свързаните с ASFV щамове. Въпреки това, **за да се получи адекватна информация за динамиката на предаване, генетичната вариация и молекулярната еволюция на различните щамове на ASFV, се изисква пълно геномно секвениране.** Към днешна дата, въпреки редовните доклади за генотип II на ASFV p72 в различни държави от Източна и Южна Африка, само един напълно аотиран пълен геном на генотип II от тези държави е публично достъпен, например Tanzania/Rukwa/2017/1, изолиран от Югозападна Танзания от заразено домашно прасе по време на огнище през 2017 г. (Njau et al. 2021). Няма щам на ASFV p72 генотип II от Малави, който е бил подложен на пълно секвениране на генома и няма щам на ASFV от Бурунди, който е бил напълно секвениран. В настоящото проучване, пълни геномни секвенции на ASFV p72 генотип X, отговорни за огнището през 2018 г. в Бурунди и вируса на генотип II, причинил огнището на АЧС през 2019 г. в Малави, са генерирани с помощта на технологията *Illumina NGS*. Пълните геномни последователности, генерирани в настоящото проучване, са тясно свързани с описаните ASFV щамове, налични в базата данни на GenBank, принадлежащи към ASFV p72 генотип X за щамата BUR/18/Rutana от Бурунди и с генотип II за щамата MAL/19/Karonga от Малави. Освен това резултатите от серотипизирането класифицират щамовете BUR/18/Rutana и MAL/19/Karonga ASFV съответно в серогрупи 7 и 8 на ASFV.

Тези констатации са аналогични с резултатите от проучвания, използващи частично нуклеотидно секвениране, при което е докладвана връзка между тези два щамата на ASFV (Bisimwa et al. 2020; Hakizimana et al. 2020), тези констатации от проучването подчертават възможността за трансгранично разпространение на генотип X вируси. Освен това високата нуклеотидна прилика между щамовете на ASFV p72 генотип II, циркулиращи в Малави и Танзания, е предварително докладвана от проучвания, използващи частичен нуклеотиден секвентен анализ, предполагащ общ източник и трансгранично разпространение на ASFV (Hakizimana et al. 2020; Misinzo et al. 2012). В допълнение, **малавийския ASFV щам има повече от 99 % нуклеотидна идентичност с ASFV p72 генотип II вируси, описани по-рано в Европа и Азия, което предполага**

евентуален общ произход на тези ASFV щамове (*Hakizimana et al. 2020; Misinzo et al. 2012; Quembo et al. 2018; Rowlands et al. 2008*).

Сравнителният геномен анализ разкрива генетична вариация в описаните в настоящото проучване щамове на ASFV в сравнение с геномите на ASFV, описани по-рано в GenBank. Например генът DP96R, за който е докладвано, че липсва в щама Uvira B53 ASFV, е присъствал в щамовете BUR/18/Rutana и MAL/19/Karonga с 93,6 % и 100 % нуклеотидна идентичност с референтните геноми на Ken05/Tk1 ASFV p72 и Georgia 2007/1 ASFV p72 генотип II. Генът DP96R кодира протеина, който потенциално участва в определянето на вирулентността на ASFV при домашни свине (*Zsak et al. 1998*) и присъствието му в щамовете BUR/18/Rutana и MAL/19/Karonga ASFV може да обясни високата вирулентност на тези щамове, както е видно от високата смъртност по време на огнищата на АЧС през 2018 и 2019 г. в региона Rutana в област Burundi и Karonga в северната част на Малави. В допълнение, гените K196R и B119L (9GL) кодират съответно ензимите тимидин киназа и сулфхидрил оксидаза, също описани като фактори на вирулентността за ASFV (*Rodriguez et al. 2015*) са присъствали в щамовете BUR/18/Rutana и MAL/19/Karonga ASFV.

Предишни проучвания са докладвали за **важна генетична вариация в рамките на членовете на MGF**, разположени в двата края на генома на ASFV, което **води до разлика в размера на генома на различните щамове на ASFV** (*Torresi et al. 2020; Urbano et al. 2021*). В настоящото проучване са наблюдавани няколко полиморфизми (SNP) и пълно ORF изтриване в рамките на различни членове на MGF. Например четири членове на MGF (MGF 100-1R, MGF 110-7L, MGF 110-8L и MGF 110-9L), отсъстващи в щамовете BUR/18/Rutana, също липсват в щамовете Uvira B53 (*Bisimwa et al. 2021*). Генът MGF 360-1Lb е отрязан в щама MAL/19/Karonga и същото наблюдение е докладвано и в щама China/2018/AnhuiXCGQ ASFV, изолиран по време на огнище на АЧС при домашни свине в провинция Anhui в Китай през септември 2018 г. (*Bao et al. 2019*). Освен това е докладвано за заличаване на почти всички членове на MGF 110 в естонски щам ASFV от 2014 г. (*Zani et al. 2018*). **Въздействието на тези генетични вариации върху фенотиповете на щамовете на ASFV, описани в настоящото проучване, е предмет на допълнителни изследвания.**

Протеинът pEP402R, хомолог на Т-лимфоцитния антиген CD2, кодиран от гена EP402R, се намира в липопротеиновата мембрана на външната вирусна обвивка и играе важна роля в хемадсорбцията и свързването на ASFV към еритроцитите по време на инфекцията (*Alejo et al. 2018*). Този ген е използван за определяне на осем вирусни антигенни типа, наречени серогрупи (*Malogolovkin; Kolbasov 2019*). Резултатите от обстойното проучване показват, че щамовете BUR/18/Rutana и MAL/19/Karonga ASFV имат същите хемадсорбционни характеристики като щамовете на ASFV, принадлежащи съответно към серогрупи 7 и 8. Съобщава се, че ASFV изолатите, класифицирани в същия серотип, показват кръстосана защита при *in vitro* експериментално заразяване с цел разработване на ваксини (*Malogolovkin et al. 2015; Sánchez et al. 2019*). Напоследък генетичните характеристики, специфични за всеки серотип на ASFV, са описани с цел изясняване на генетичното и антигенното разнообразие на ASFV (*Malogolovkin et al. 2020; Urbano et al. 2021*).

В заключение, резултатите от това проучване предоставят важна представа за генетичната структура на генотип X на ASFV p72, отговорен за огнището през 2018 г. в Бурунди и вируса на генотип II, причинил огнището на АЧС през 2019 г. в Малави. Освен това щамовете BUR/18/Rutana и MAL/19/Karonga са класифицирани съответно в ASFV серогрупи 7 и 8. Тези резултати ще служат като основа за възможни бъдещи изследвания относно молекулярната еволюция, динамиката на предаване, диагностичните подобрения и стратегиите за контрол на ASFV.

Name of the strain	GenBank accession number	Country of origin	Year of collection	p72 genotype	Length (bp)	Percentage of identity with MAL/19/Karonga (%)	Percentage of identity with BUR/18/Rutana (%)	Host species
Mkuzi1979	AY261362	South Africa	1979	I	192,714	97.95	93.35	Tick
Benin 97/1	NC_044956	Benin	1997	I	182,284	97.91	93.01	Domestic pig
Liv 13/33(OmLF2)	MN913970	Zambia	1983	I	188,277	98.29	93.29	Tick
MAL/19/Karonga	MW856068	Malawi	2019	II	183,325	100	93.42	Domestic pig
Arm07/CBM/c2	LR812933	Armenia	2007	II	190,145	99.95	93.45	Domestic pig
Georgia 2007/1	NC_044959.2	Georgia	2007	II	190,584	99.95	93.45	Domestic pig
ASFV-wbBS01	MK645909	China	2018	II	189,394	99.90	93.44	Wild boar
Tanzania/Rukwa/2017/1	LR813622	Tanzania	2017	II	183,186	99.97	93.44	Domestic pig
Warmbaths	AY261365	South Africa	1987	III	190,773	96.83	93.45	Tick
Warthog	AY261366	Namibia	1980	IV	186,528	97.50	93.11	Warthog
Tengan62	AY261364	Malawi	1962	V	185,689	96.72	93.34	Domestic pig
MalawiLil-20/1(1983)	AY261361	Malawi	1983	VIII	187,612	94.62	93.42	Tick
Ken06.Bus	NC_044946	Kenya	2006	IX	184,368	92.78	97.71	Domestic pig
R 35	MH025920	Uganda	2015	IX	188,629	92.79	97.71	Domestic pig
BUR/18/Rutana	MW856067	Burundi	2018	X	176,564	93.42	100	Domestic pig
Ken05/TKI	NC_044945	Kenya	2005	X	191,058	93.74	99.08	Tick
ASFV Ken/rie1	LR 899131	Kenya	2019	X	189,950	93.49	98.98	Tick
Uvira B53	MT956648	DRC	2019	X	180,916	92.26	99.34	Domestic pig
Kenya 1950	AY261360	Kenya	1950	X	193,886	93.64	98.95	Domestic pig
Zaire	MN630494.2	DRC	1977	XX	184,820	96.68	93.77	Domestic pig
RSA_2_2004	MN641877.2	South Africa	2004	XX	189,903	95.27	92.22	Wild boar
RSA_2_2008	MN336500.3	South Africa	2008	XXII	190,066	94.17	90.50	Tick

Достъпни до момента аотирани и публикувани в генната банка пълни геномни секвенции на ASFV, изолати от Африка, Азия и Европа

В проучване на тема: „*Whole-Genome Sequence of African Swine Fever Virus isolate from India provides insights into diversity and evolution*“ на авторски колектив *Sonalika Mahajan, Juwar Doley, Saravanan Subramaniam, Ajay K. Yadav, Seema Rani Pegu, Narayana H. Mohan, Vishal Chander, Karikalan Mathesh, Sukdeb Nandi, Karam Pal Singh, Vivek Kumar Gupta and Gaurav Kumar Sharma* се разглежда генома на ASFV, който се състои от линейна, двойноверижна ДНК молекула с размер между ~170-190 kb и кодира повече от 150 отворени рамки за четене (ORFs). Скорошното постъпване на ASFV в Китай (2018 г.), Мианмар (2019 г.) и Индия през 2020 г. има сериозни икономически последици и представлява сериозна заплаха за индустрията на свинско месо по целия свят. Изчислено е, че около 54 150 прасета са умрели в Индия до юли 2021 г., което е довело до преки загуби в размер на 2,76 милиарда INR. През 2020 г. е публикувано първото лабораторно потвърждение на АЧС от Индия и изолатите са причислени към post-2007-p72-генотип II въз основа на частична характеристика на генома на изолати ASFV. Досега 24 генотипа на ASFV са описани в световен мащаб въз основа на гена p72. Въпреки това, все още не е докладвана пълна характеристика на генома на изолати на ASFV, циркулиращи в Индия. В настоящото изследване, пълната кодираща област на щамата ASFV (ASF/IND/20/CAD/543), получена директно от полева

проба, е определена чрез секвениране от следващо поколение. **Цялостно геномно сравнение на ASF/IND/20/CAD/543 и сравнението на генома на изолата с целогеномно секвенирани ASFV изолати от цял свят показва неговата отличителност и дава представа за еволюцията на ASFV и трансграничното му разпространение.**

Сред пробите е избран един представителен изолат (ASF/IND/20/CAD/543) за следващо поколение секвениране. Нуклеиновата киселина е екстрахирана от тъканната проба с помощта на QIAamp кит за екстракция на ДНК съгласно препоръчания протокол. Библиотека за секвениране е приготвена с кит за подготовка на библиотека TruSeq (Illumina, САЩ), последвана от секвениране чрез система NextSeq 500 (Illumina, САЩ) за генериране на 2 X 150bp сдвоени секвенции. Последователно първичните данни са обработени за получаване на висококачествени секвенции с помощта на *Trimmomatic v0.38* за премахване на адаптерни последователности, неправилно прочетени последователности и последователности с ниско качество. Висококачествените секвенции са сравнени с референтни ASF геноми на щам BAV17, налични в базата данни на NCBI (NC_001659.2), последвано от анотация на генома. Анотацията е извършена с помощта на софтуер GATU. Висококачествените секвенции са анотирани в съответствие с референтната последователност с помощта на алгоритъма *Burrows–Wheeler transform*. Данните за последователността са налични в базата данни *BioSample*. Консенсусна последователност от 170 095 bp е извлечена с помощта на програма *MPILEUP* на *Samtools v 0.1.18*.

Общо 35 геномни последователности, представляващи вирусни щамове от различни ендемични страни, са получени от GenBank. Последователното подравняване е извършено с помощта на MAFFT и е създадена матрица за нуклеотидна идентичност с помощта на BioEdit 7.2.5. Филогенетичният анализ е извършен на базата на целия геном и три различни гена, а именно B646L, KP177R и A238L, използвайки максимална съвпадаемост, налична в MEGA X с 1000 начални репликации.

Пълният геном на ASFV от индийския изолат се състои от 170 095 нуклеотида с 144 отворени рамки за четене (ORFs), 2 806 SNP и средно GC съдържание от 37,6%. Геномната последователност на ASFV изолат ASF/IND/20/CAD/543 е депозирана в GenBank с номер OK236383. Индийските изолати, секвенирани в изследването, принадлежат към генотип II и са 100% хомоложни с изолати, събрани по-рано от огнища в други индийски области Аруначал Прадеш и Асам между януари и април 2020. До момента извън Африка са докладвани само генотипове I и II, като генотип II е отговорен за продължаващата епидемия и има най-глобално значение. **АЧС генотип II вируси са били идентифицирани в редица европейски страни от 2007 г., наскоро в Китай и Югоизточна Азия и последно в Индия.** Цялата филогенеза, базирана на генома, показва, че този вирус принадлежи към клейд 1.1.1/beta, което е в съответствие с предишни проучвания. Преди това на базата на пълен геномен секветен анализ, генотип II изолати ASFV са групирани в клейд 1.1.1, който също включва генотип I. Такива несъответствия между филогенезата на базата на геномния p72 регион и целият геном също е докладван в по-ранни проучвания. За разлика от генотипирането на база p72 ген на ASFV, в момента няма универсална система и одобрени протиколи за пълен геномен секветен анализ.

Размерът на генома на индийския изолат на АЧС е по-малък от наскоро съобщения Танзания/Rukwa/2017/1 изолат (170095 срещу 183186) с по-малък брой ORF (144 срещу 188) и повече SNP от танзанийски или полски или китайски изолати. Причината за липсващи ORF в момента не е известна, но вероятно не е от съществено значение за вирусната репликация. Освен това има вмъкване на TRS между I73R и I329L. Извършен е също филогенетичен анализ на базата на гени KP177R и A238L. KP177R кодира p22, структурен вирусен протеин, който е рано транскрибиран и открит в ASFV и се смята, че p22 е отговорен за инвазирането на различни гостоприемници. Филогенетичното дърво е направено съобразно KP177R гена, което показва **пълна липса на връзка с изолати от различни генотипове и изолати от генотип II, събрани от Естония през 2014 г.** В случай на филогенетичен анализ на база ген A238L, клъстерирането на генотипа на база p72 е запазен в по-голяма степен. Има три основни клейда в модела на групиране на p72, с генотипове I, II и III, образуващи един клейд, генотипове IX и X, образуващи един клейд, и генотип VIII, образуващ само един клейд. Въпреки това, само при филогенетичния анализ, базиран на ген A238L, са открити две първични клейда, като генотипове I, II и III са запазени в един клейд. Горните констатации предполагат, че **генът A238L може да се използва като допълнителен базиран на p72 филогенетичен анализ. Наблюдаваните разлики в моделите на групиране, особено при единични гени, биха могли се дължат на различни фактори, включително еволюционни процеси, които водят до еволюция на вирусния геном.** В това проучване екипът от учени съобщава за първата характеристика на ASFV, базирана на целия геном, и принадлежащ към генотип II изолат от Индия. Изолатът е причислен към генотип II и клейд 1.1.1. Отделното филогенетичният анализ на индийския изолат ASFV на базата на целогеномно секвениране показва еволюцията на генома, и еволюцията в разпространението му, тъй като вирусът се разпространява в различните страни и континенти с различен климат. Проучването отново **подчертава уместността на целогеномното секвениране, биоинформатичния анализ и геномното охарактеризиране и класификация на този вирус и огромната роля на тези нови молекулярни методи в разбирането на молекулярната еволюция на ASFV и епидемиологично проследяване на разпространението на болестта.**

New developments of the epidemic in the reporting period	<p>Since ASF emerged in western Poland in November 2019, surveillance efforts, in particular examination of wild boar found dead, were intensified in the regions of Germany bordering with Poland. The first case of ASF in wild boar in Germany was detected at approximately 6 km from the Polish border by passive surveillance and confirmed on 10 September 2020. Phylogenetic analysis of the ASFV whole-genome sequence generated from material of the first carcass detected in Germany revealed that it groups with ASFV Genotype II including all sequences from Eastern Europe, Asia and Belgium.</p> <p>In the weeks and months after the first finding, there were several independent virus entries caused by continuous infection pressure along the border with Poland. Several different clusters could be identified along the border. The course within the individual clusters in Germany was comparable to that in Czechia and Belgium, but the overall situation showed clear differences, due to the multitude of clusters. According to the estimated minimum post-mortem intervals (PMI), which were estimated from the decomposition of the wild boar carcasses, ASFV was most likely to be introduced into Germany in the beginning of July 2020, at the latest (Sauter-Louis et al., 2021).</p>
--	--

Проучване на тема „*A Method for the Analysis of African Swine Fever by Viral Metagenomic Sequencing*“ на *ChiHai Ji, JingZhe Jiang, YingFang Wei, ZhiYuan Wang, Yong Jie Chen, ZhanZhuo Mai, MengKai Cai, ChenXiao Qin, Yu Cai, HeYou Yi, Guan Liang, Gang Lu, Lang Gong, GuiHong Zhang and Heng Wang* е още едно потвърждение за безспорната полза и високата диагностична специфичност и чувствителност на целогеномното секвениране и голямото количество информация и данни, които то предоставя в случая за ASFV. ASFV геномът е относително запазен и естествената му вариация е много бавна, но взаимодействието с гостоприемника и стимулирането чрез фактори на околната среда може да ускори предаването на ASFV и еволюцията му. Като се има предвид настоящата липса на информация за генома, е необходимо да се насърчи целогеномното или метагеномното секвениране на ASFV. През последните години разработването на технология за секвениране осигури техническа подкрепа за секвенирането на целия геном.

Методът на *macro virus group* (виром) директно използва генетичния материал на всички вируси в пробите за анализ. Първо, вирусните частици се обогатяват, получава се информация за геномната последователност и след това се идентифицират съставът и относителното изобилие на всички вируси. Този метод е мощно средство за откриване на нови вируси и ранно откриване и контрол на вирусната инфекция. Той е от голяма полза при изучаването на произхода и еволюционните модели на вирусите, генетичното разнообразие, географското разпределение и връзката между вирусите и техните гостоприемници. В ранния етап е използвано секвениране от първо поколение за секвениране на целия геном на огнището на *Guangdong ASFV* и е представена последователността в GenBank (номер: MT496893.1). Поради отнемащата време характеристика и биоинформатичен анализ на секвенирането от първо поколение, метода за анализ на секвенциите е подобрен, базирайки се на метода на *macro virus group*. В този експеримент вирионите в тестовия микс се пречистват и концентрират чрез свръхскоростна центрофуга, а обогатителният градиентен слой на вирионите след това се определя от qPCR, за да се получат вириони с по-висока чистота за екстракция на вирусна ДНК. Пробите с висока чистота дават висококачествени данни за сглобяване и анализ след секвенирането. Извършен е контрол на качеството на данните, отстраняване на геномните секвенции на гостоприемника, класификация на вируса, събиране на данни, идентификация на вирусната секвенция, статистически анализ на изобилието от вируси, генно прогнозиране и функционален анализ. Поради високия процент на грешки при методите за секвениране от второ поколение, са използвани различни методи за идентификация на таргетния вирус, за да се възстанови колкото е възможно повече разнообразието и изобилието от вируси в пробата.

Резултатите от контрола на качеството на данните показват, че данните, получени чрез тази методология са с доста високо качество. Общо 1,351 282 четения (3,8 % от 34 783 974 четения) са картографирани към целия геномен регион на щама MT496893.1, със средна дълбочина 1233. И накрая, шамът MT496893.1 е използван като отправна точка за корекция и сглобяване на генома и накрая е получен геном от 188 035 kb. Ако тъканта може да бъде смляна, центрофугирана и пречистена, високата чистота и концентрация на вирусните частици могат теоретично да бъдат стратифицирани за секвениране от второ поколение и не се изисква изолиране на вируса, което ще съкрати

времето за получаване на резултатите. Използвайки клинични проби и свръхскоростна центрофуга за получаване на висока чистота на вирусните частици, се потвърждава, че може да се получат висококачествени данни за секвениране; това е от полза за последващото събиране и анализ на данни поради **по-навременното цялостно секвениране на генома на шамовете ASFV**, изолирани от огнището, което **улеснява анализа на произхода и развитието на АЧС, охарактеризиране на генетичното разнообразие и географското разпределение**. В обобщение, тези резултати потвърждават **полезността на виромното секвениране като метод за директно секвениране на ASFV геноми от PCR-позитивни тъканни проби**.

Допълнителни проучвания на ASFV посредством WGS и изтъкнати ползи от внедряване на тези нови геномни техники в диагностиката:

- *Whole-Genome Sequence of an African Swine Fever Virus Isolate from the Czech Republic - Jan H. Forth, Leonie F. Forth, Petr Václavěk, Pavel Barták, Dirk Höper, Martin Beer, Sandra Blome:*

In conclusion, we are convinced that only whole-genome sequences, together with harmonized protocols and data sharing, can serve as a basis for the identification of new genetic markers that are needed for molecular epidemiology approaches and therefore are of utmost importance in the fight against ASF. “

- *Genetic Characterization and Variation of African Swine Fever Virus China/GD/2019 Strain in Domestic Pigs - Xun Wang, Xiaoying Wang, Xiaoxiao Zhang, Sheng He, Yaosheng Chen, Xiaohong Liu and Chunhe Guo:*

This study investigated the genomic characterization of an ASF outbreak in 2019 in Guangdong province, China. Genetic analysis indicates that the China/GD/2019 strain, which has new variations, is closely related to the genotype II ASFV isolates. Although belonging to genotype II, the ASFVs associated with the outbreaks in the Northern provinces “ of China have genetic diversity, and these outbreaks are correlated. Phylogenetic tree and comparative genomic analysis in this study will have multiple applications to improve our understanding of the degree of genetic evolution and variation differences between different isolates. This study provides useful information for exploring key factor of ASFV vaccine development. “

- *The first complete genome sequence of the African swine fever virus genotype X and serogroup 7 isolated in domestic pigs from the Democratic Republic of Congo - Patrick N. Bisimwa, Juliette R. Ongus, Lucilla Steinaa, Espoir B. Bisimwa, Edwina Bochere, Eunice M. Machuka, Jean-Baka Domelevo Entfellner, Edward Okoth and Roger Pelle:*

African swine fever outbreaks were reported in South Kivu in 2019 causing mortality in domestic pigs. We report for the first time the complete genome sequence of the ASFV Uvira B53, a genotype X and serogroup 7 strain involved in outbreaks in South Kivu. Its similarity with Kenya 1950 strain based on MGF members suggests that it is a virulent strain, corroborated by the symptomatic phenotype of the pig from which the sequenced strain originated. Uvira B53 is the third ASFV genotype X genome sequence, after Kenyan ones, reported to date. The uncontrolled transboundary movements of pigs and pig products in the region together with our data and previous reports on the presence of ASFV p72 genotype X (10, 12, 38, 39) raise the point that Uvira B53 could derive from Kenya 1950. However, further phylogenomic analysis is required to ascertain this relationship. The new genomic information reported in this study provides further insights for tracing geographical spread and biological evolution of the ASF virus, which are essential for the identification of origin and chains of transmission of the pathogen as well as the design of prevention and control strategies of this disease.

”

“

- *The first genotype II African swine fever virus isolated in Africa provides insight into the current Eurasian pandemic - Emma P. Njau, Jean-Baka Domelevo Entfellner, Eunice M. Machuka, Edwina N. Bochere, Sarah Cleaveland, Gabriel M. Shirima, Lughano J. Kusiluka, Chris Upton, Richard P. Bishop, Roger Pelle & Edward A. Okoth:*

genotype II. A more comprehensive analysis of the comparative evolution of ASFV genotypes I and II, which have assumed global importance due to their transportation to Eurasia and Latin America with resulting major impact on pig production and pig keepers, will become increasingly possible as additional ASFV genomes from the African continent are sequenced and annotated.

”

“

- *Dynamics of African swine fever virus (ASFV) infection in domestic pigs infected with virulent, moderate virulent and attenuated genotype II ASFV European isolates - Carmina Gallardo, Alejandro Soler, Imbi Nurmoja, Cristina Cano-Gómez, Svetlana Cvetkova, Maciej Frant, Grzegorz Woźniakowski, Alicia Simón, Covadonga Pérez, Raquel Nieto, Marisa Arias*
- *Effect of mixing and feed batch sequencing on the prevalence and distribution of African swine fever virus in swine feed - Catherine Grace Elijah, Jessie D. Trujillo, Cassandra K. Jones, Taeyong Kwon, Charles R. Stark, Konner R. Cool, Chad B. Paulk, Natasha N. Gaudreault, Jason C. Woodworth, Igor Morozov, Carmina Gallardo, Jordan T. Gebhardt, Jürgen A. Richt:*

In conclusion, sequencing with four batches of feed after contamination of a feed mill with ASFV can decrease overall ASFV contamination within feed samples, but not eliminate it entirely. In addition, collecting 10 evenly distributed samples using an 'X' pattern collection system allows for the detection of ASFV genetic material under the conditions of the current investigation. The findings of this study highlight the importance of excluding ingredients from ASFV-endemic countries, but also highlights that proper sampling can be an effective tool to detect ASFV contamination. Additional research is necessary to evaluate the combination of mitigation techniques like chemically treating flush diets (similar to what is done with PEDV) on ASFV-contaminated ingredients.

”

“

- Не на последно място в съвсем скорошен уебинар на тема: „*Another deadly virus ASFV detection and sequencing via Oxford Nanopore*“ е разгледан **протокол за секвениране на вируса на африканска чума по свине посредством платформата на Oxford Nanopore.**

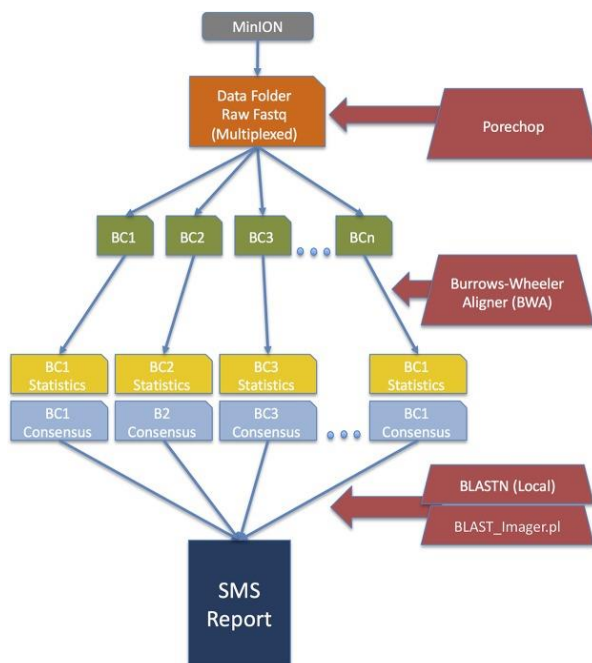
Поради своя размер и други ограничения, геномът от 170-190 kbp ДНК вирус не е добре секвениран, с по-малко от 200 геномни последователности, налични в публичните бази данни. В този уебинар бе представен **ефективен, евтин метод за секвениране на ASFV в мащаб.** Методът, който е предложен от Oxford Nanopore, използва PCR амплификация на вируса за **постигане на по-голямо покритие, като съчетава в себе си мултиплексност и точност,** заедно с предимството, че техниката е **преносим секвенатор и термосайкълър,** което е огромно **предимство при полеви изпитвания на терен** и необходимост от бърз резултат и реакция, предимства, които не са напълно постижими с помощта на *shot gun sequencing*. Представен бе и **изструмент за асемблиране на геномните последователности Lilo,** който **не разчита на приравняване спрямо референтен геном, което позволява структурни вариации и сглобяване на хиперпроменливи региони,** за които други методи не успяват. **Геномите на ASFV, секвенирани по този метод, са почти завършени,** липсват само части от силно повтарящите се 3' и 5' теломерни региони и имат **високо ниво на точност.** Тези методи ще позволят **секвениране на ASFV с оптимална ефективност и висока разделителна способност** за наблюдение и действие върху разпространението на вируса като част от глобалния панзоотичен отговор.

- *Rapid Sequence-Based Characterization of African Swine Fever Virus by Use of the Oxford Nanopore MinION Sequence Sensing Device and a Companion Analysis Software Tool - Vivian K. O'Donnell, Frederic R. Grau, Gregory A. Mayr, Tracy L. Sturgill Samayoa, Kimberly A. Dodd, Roger W. Barrette:*

Полезността на технологията за секвениране на Nanopore, и по-специално на секвенатора MinION от Oxford Nanopore Technologies (ONT), е оценена като инструмент

за секвениране за бързо откриване и характеризиране на ASFV. Устройството за разпознаване на последователност MinION има няколко **предимства**, както следва: изисква **ниска първоначална инвестиция**, **извършва секвениране с дълго четене**, **разчита двуверижна ДНК (dsDNA) с минимална модификация и генерира данни в реално време**.

Секвенаторът MinION, съчетан с придружаващия инструмент за асемблиране и анализ в реално време (инструментът за бърз анализ на африканска чума по свинете [ASF-FAST]), бързо произвежда висококачествени данни за последователност с голяма дължина, достатъчни за откриване и разчитане на пълния геном на ASFV от клетъчно културални изолати, както и проби от цяла кръв от експериментално заразени прасета. В последващ експеримент е извършено обогатяване на вирусната нуклеинова киселина чрез отстраняване на метилираната от гостоприемника ДНК от пробите. Обогатяването е довело до умерено подобрение в общия процент на специфични за ASFV секвенции, намалявайки времето, необходимо за първоначално откриване на вируса и разделяне на последователността на пълния геном. Това е първият доклад, комбиниращ обогатяване на пробата с технологията MinION и придружаващ софтуер за анализ, за да позволи **истинско откриване в реално време на геномната последователност на ASFV**. Тази работа демонстрира **полезността на тази технология за диагностика, базирана на секвениране от ново поколение, подпомагаща ефективно управление и навременно вземане на мерки и решения при спешни случаи, в случай на избухване на огнище**.



Схематично представен процеса по секвениране и софтуерната обработка и анализ на секвенциите чрез MiniON

Скорошното бързо разпространение на ASFV в Западна Европа и в цяла Азия подчертава необходимостта от разработване на по-бързи диагностични тестове, способни за ранно откриване и характеризиране в реално време на циркулиращите вируси. Оптимизирането на диагностичните методи, които могат да се прилагат

широко, ще бъде от решаващо значение в случай на огнище за ограничаване на икономическите загуби и осигуряване на адекватна намеса и вземане на мерки за контрол и ерадикация на болестта.

Предидшни проучвания са изследвали използването на NGS и биоинформатичен анализ за откриване и идентифициране на ASFV от клинични проби, изолирани от различни огнища. Повечето **съвременни NGS инструменти** изискват **значителни капиталови инвестиции**. Освен това, **обработката на пробите за стандартен NGS** след пристигането в лабораторията **изисква време и ресурсоемки лабораторни подготовки**. Широко използваните протоколи изискват **17-часово време за обработка**, забавяйки анализа и интерпретацията на резултатите.

В това проучване технологията Nanopore, в частност устройството MinION, заедно с ASF-FAST за идентифициране и характеризиране на ASFV в реално време е идентифицирала последователности, специфични за ASFV, още 6 минути след започване на секвенирането, а пълна геномна последователност от множество ASFV щамове, култивирани в клетъчни култури, и цяла кръв са получени за около 4 h. Докато анализът представлява минимална част от времето, необходимо за генериране на крайните резултати, той може да варира в зависимост от количеството данни. Анализът на данните на Nanopore може да бъде донякъде променлив и може да бъде повлиян от това дали потребителят разчита на анализ, базиран на облачна технология, и вида на изчислителните ресурси, които се използват за анализа.

Едно от най-големите **предимства на платформата Oxford Nanopore MinION** е възможността за **генериране на данни в реално време**, като по този начин улеснява **бързия анализ**, който е от решаващо значение по време на разследване на патогени с високи последици като ASFV. Този вид секвениране в реално време може да бъде ценен за други ДНК вируси също. Друго предимство на платформата MinION пред други системи е **възможността за бърза подготовка на пробата**. Библиотеките са готови за зареждане в *flow cell* в рамките на 2 h и 15 минути след екстракция и обогатяване на нуклеинова киселина. Тъй като PCR е по-бърз и по-евтин за изпълнение, той остава избран като златен стандарт - тестът за скрининг на проби. Въпреки това, **секвенирането има предимството да предоставя много по-обстойни, информативни и пълни данни и дава възможност за откриване на варианти или последователности, които може да не са открити чрез PCR тестване**.

Друго предимство на системата Oxford Nanopore MinION, е **подобряването на библиотеките за секвениране, насочени към ASFV, чрез увеличаване на броя на четенията, специфични за ASFV, спрямо общите показания**. Това се постига с помощта на комплект за обогатяване на метилирана ДНК за специфично намаляване на гостоприемниковата ДНК, като същевременно оставя неметилираната вирусна ДНК на АЧС непокътната в екстрахираната проба. Това има ефект на **бързо генериране на геномни данни за ASFV** поради умереното изместване на фокуса към секвениране на вирусната нуклеинова киселина спрямо тази на гостоприемника. Този метод също така използва **обработката на данни в почти реално време и генерирането на данни, свързани с платформите Oxford Nanopore и способността му да произвежда бързо FASTQ файлове с необработени секевнтни данни**. Това е ценно подобрение, тъй като висококачествените проби, които са били успешно обогатени и секвенирани, могат да

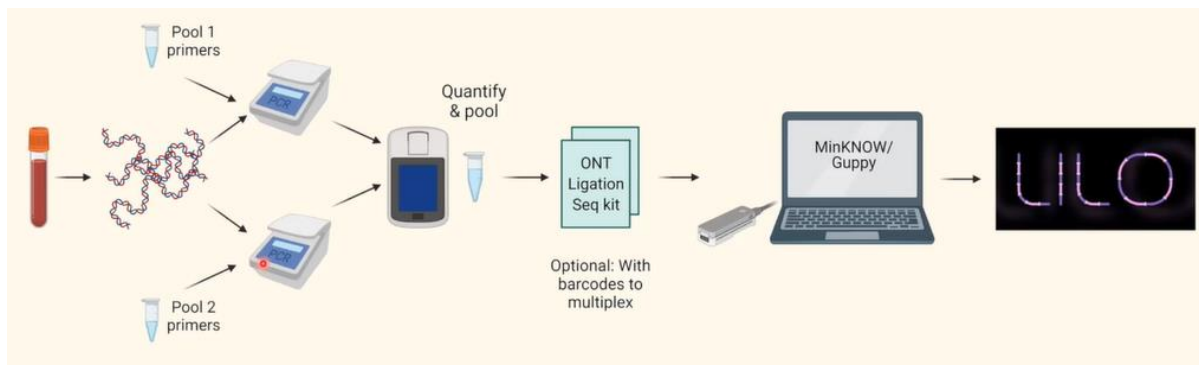
генерират приложими необработени данни, представляващи до 100% от генома на ASFV Georgia, за по-малко от 10 минути от началото на секвенирането. Това, съчетано с придружаващ софтуер за анализ (ASF-FAST), позволява **бързо сглобяване на последователност и характеризирание на генома на ASFV** с диагностична насоченост.

Демонстрирано е, че обогатяването на пробите с помощта на метилирания комплект е особено важно за използване платформата Oxford Nanopore, тъй като устройството за измерване на последователността е чувствително към намаленото качество на пробата, което води до по-нисък общ изход за всички проби, включени в цикъла. Също така е наблюдавано, че извършването на хибридизация на метилирана ДНК, изглежда подобрява ефективността на секвенирането като цяло.

Решението за мултиплексиране на проби трябва да бъде оценено спрямо очакваното качество на пробата, тъй като общата производителност на висококачествени проби се влияе от наличието на проби с ниско качество. За целите на бързото характеризирание, базирано на секвениране, мултиплексирането на проби може да бъде достатъчно за филогенетично характеризирание на щамата на ASFV, но става по-малко вероятно пълният геном да бъде напълно разчетен, тъй като може да има значително забавяне за разделяне на последователността, тъй като повече проби са включени в пробата. Секвенирането, подобно на PCR, е свързано и с някои проблеми с качеството на пробата, включително общото състояние на пробата, наличието или отсъствието на инхибитори и първоначалната концентрация на вируса в пробата. Независимо от този недостатък, са показани висококачествени резултати от секвениране на целия геном на ASFV от цяла кръв, което показва, че тази процедура отговаря на „критериите за пригодност“.

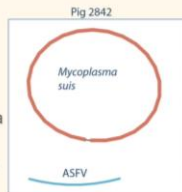
Един ценен аспект на употребата на секвенатора MinION е неговата преносимост и потенциалните приложения за анализ на терен. Това е довело до разработване на комплект за секвениране при полеви условия (ONT), който има двойните предимства на (i) **да не изисква хладилни условия поради лиофилизация на реагентите** и (ii) **по-бързо време за обработка, отколкото при други налични комплекти за подготовка на библиотеките**. Подготовката на библиотеки е по-бърза с комплекта за секвениране на терен, изисквайки **само 15 минути за генериране на библиотеките** след екстракция и обогатяване на нуклеиновата киселина. Въпреки това, производителността на секвенсера MinION с проба, обработена с комплекта за секвениране на терен, е по-ниска и времеемка за генериране на последователност, с повишена латентност между наличните файлове с данни. Освен това данните за последователността не могат да бъдат напълно разчетени и анализирани от проби, обработени с комплекта за секвениране на терен, за разлика от комплекта за бърза подготовка на библиотеки. Независимо от това, използването на комплекта за секвениране на терен като комплект за подготовка на библиотеките, заедно със системата MinION като преносим секвенатор в реално време, може да се използва в случай на вземане на проби от високо рискови региони или ферми или пък установена клиника при животни на място или пък при възникнало огнище и когато няма налични лабораторни съоръжения или инфраструктура. Въпреки че полевият комплект няма да осигури същата степен на цялостно покритие на генома, комплектът позволява на потребителя да получи **резултат за кратко време** от момента на получаване на пробата.

Технологията Nanopore е важен инструмент, който може да бъде използван за бързо наблюдение на много места и региони по света със значителен риск от ASFV. Секвенсерът MinION е достъпен за повечето лаборатории при **минимална първоначална капиталова инвестиция**. Платформата може да се използва в региони, които извършват тестове, в лаборатории без достатъчно развита инфраструктура и на място. В заключение, **тази технология е бърза и надеждна за секвениране на ASFV в реално време, която заедно с придружаващия софтуер ASF-FAST позволява генериране на данни за минути. Това е от съществено значение за ефективно управление при извънредни ситуации в случай на огнище на заболяване и води до намаляване на икономическите загуби и по-бърза намеса за контрол на болестта.**

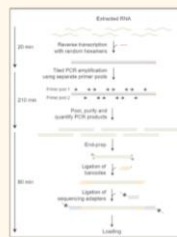


Sequencing ASFV directly

- We can sequence and assemble the genome from DNA extracted from blood
- This is not very efficient
 - We sequence a lot of pig (0.04-0.15% of data ASFV)
 - We might not get enough ASFV to assemble
- Fine for a yes/no, not so useful for epidemiology
- We do get to see co-infections though!



ARTIC tiled amplicon method



- Tiled amplification and sequencing of a virus
 - SARS-CoV-2 (~30kb genome, 2 pools of 49 400bp amplicons)
 - Ebola (~18kb genome, 2 pools of 31 400bp amplicons)
 - Nipah (~18kb genome, 2 pools of 30 400bp amplicons)
- All RNA viruses

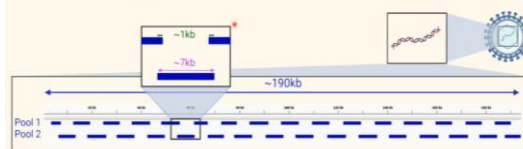
Primer design

- All of the ASFV genomes that were available at the time (28 genomes) multi-sequence aligned with clustal
- Primal Scheme primer design
- A lot of tweaking, replacing and optimisation involved



Multiplex PCR method for MinION and Illumina sequencing of Zika and other virus genomes directly from clinical samples

ASFV is huge... but it is also a DNA virus



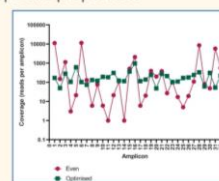
- 32 primer pairs
- 7kb amplicons w/ 1kb overlap
- We can get away with this size because DNA is more stable than RNA

DNA extraction

- No special extraction needed
 - We extracted DNA from blood using a Phenol/chloroform extraction, but there's no reason a kit/automated extraction won't work.
- Fresher samples yield better results
 - However, downstream methods can be tweaked if poorer quality samples are being used
- After a couple of years of freeze/thaws our original samples are now knackered, but they lasted longer than anyone expected

Primer pools

- Primer pools must be mixed with specific proportions



Primer Pair	Sequence ID #1	Pool	Pool
1	GGGTTTATTTCAGAGATTC	01	01
2	TTGGGTTTATTTCAGAGATTC	01	01
3	GGGTTTATTTCAGAGATTC	01	01
4	GGGTTTATTTCAGAGATTC	01	01
5	GGGTTTATTTCAGAGATTC	01	01
6	GGGTTTATTTCAGAGATTC	01	01
7	GGGTTTATTTCAGAGATTC	01	01
8	GGGTTTATTTCAGAGATTC	01	01
9	GGGTTTATTTCAGAGATTC	01	01
10	GGGTTTATTTCAGAGATTC	01	01
11	GGGTTTATTTCAGAGATTC	01	01
12	GGGTTTATTTCAGAGATTC	01	01
13	GGGTTTATTTCAGAGATTC	01	01
14	GGGTTTATTTCAGAGATTC	01	01
15	GGGTTTATTTCAGAGATTC	01	01
16	GGGTTTATTTCAGAGATTC	01	01
17	GGGTTTATTTCAGAGATTC	01	01
18	GGGTTTATTTCAGAGATTC	01	01
19	GGGTTTATTTCAGAGATTC	01	01
20	GGGTTTATTTCAGAGATTC	01	01
21	GGGTTTATTTCAGAGATTC	01	01
22	GGGTTTATTTCAGAGATTC	01	01
23	GGGTTTATTTCAGAGATTC	01	01
24	GGGTTTATTTCAGAGATTC	01	01
25	GGGTTTATTTCAGAGATTC	01	01
26	GGGTTTATTTCAGAGATTC	01	01
27	GGGTTTATTTCAGAGATTC	01	01
28	GGGTTTATTTCAGAGATTC	01	01
29	GGGTTTATTTCAGAGATTC	01	01
30	GGGTTTATTTCAGAGATTC	01	01
31	GGGTTTATTTCAGAGATTC	01	01
32	GGGTTTATTTCAGAGATTC	01	01

PCR amplification

- 2 pools, plus primer pair 1 (3 PCRs per sample)

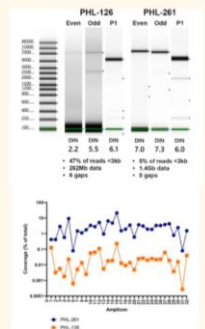
12.5ul HS VeriFi Master Mix
2.5ul Odd or Even pool 10uM
2ul ASFV DNA (1:10)
8ul NF H2O

98°C 1 min
98°C 15 secs
60°C 15 secs
72°C 4:40 mins
72°C 5 mins
10°C Hold

40 cycles

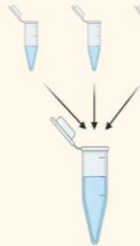
Post-amplification QC

- Fresh samples are likely to amplify well, degraded samples will amplify less well.
- You should still be able to sequence either, but amplification of degraded samples will affect multiplexability
- Additional bead clean ups for size selection may improve this



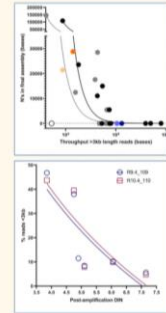
Amplicon pooling

- Amplicons should be quantified by fluorometer and pooled as follows:
 - Pool 1: 48%
 - Pool 2: 50%
 - Primer pair 1: 2%

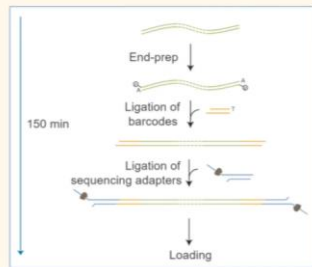


Multiplexing

- Depends on typical sample quality
 - Fresh sample from a farm ✓
 - Sample of indeterminate age from decomposing wild boar X
- Ideally QC your first few samples and decide how many to multiplex based on post-amplification DIN and typical throughput you get on your flow cells



Library prep

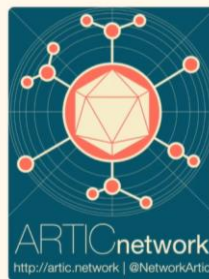


Basecalling/demultiplexing

- If you have a GPU and aren't in a rush:
 - Super accuracy or duplex
- If you have limited computation power/time:
 - High accuracy will do fine
- Demultiplex
 - Porechop
 - Guppy barcoder
- Optional: filter out any reads horrendously longer/shorter than your amplicons- speed up the analysis and prevents misassembly from PCR artefacts

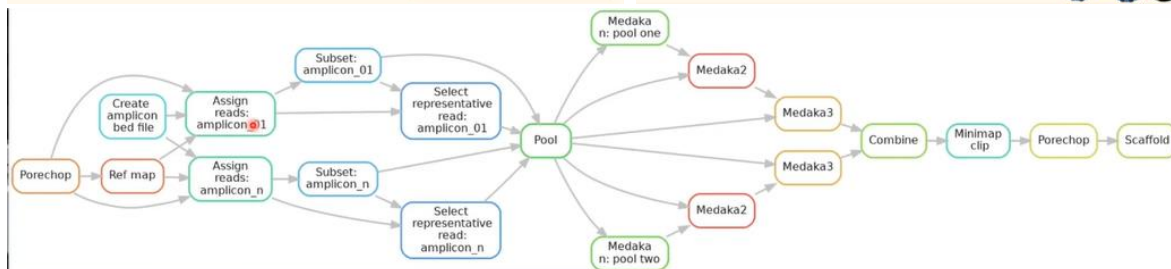
Artic pipeline

- Artic pipeline aligns reads to a reference and uses polishing tools to create a consensus
- This works very well, unless:
 - There are significant structural differences between the reference and the reads
 - There are particularly repetitive regions that may cause mismapping



Lilo

- Lilo polishes the amplicons themselves, then stitches them together
 - We designed the amplicons, we know what they look like and what order and orientation they go in
 - Split the reads into amplicons
 - Polish amplicons
 - Align to reference to get order
 - Stitch together at overlaps



Схематично представена системата NanoPore MinION и софтуерният продукт LILO, протоколът за работа със системата и постигнатите резултати при оценка на производителността и качеството им

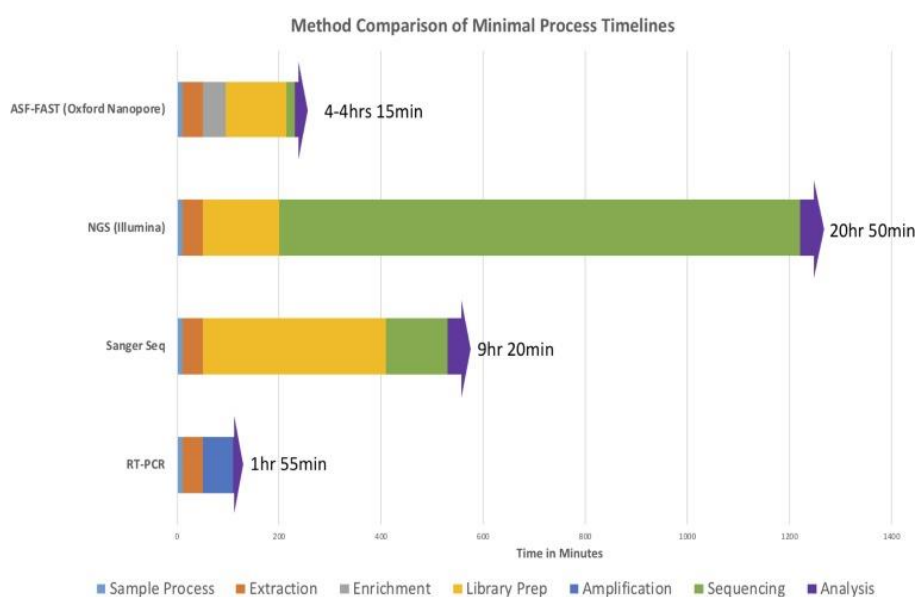
- No part gets left behind: Tiled nanopore sequencing of whole ASFV genomes stitched together using Lilo - Amanda Warr, Caitlin Newman, Nicky Craig, Ingrida Vendelė,

Rizalee Pilare, Lilet Cariazo Cruz, Twinkle Galase Barangan, Reildrin G Morales, Tanja Opriessnig, Virginia Mauro Venturina, Milagros R Mananggit, Samantha Lycett, Clarissa YJ Domingo, Christine Tait-Burkard:

The availability of a portable sequencing technology opens new doors to travel to outbreak locations, sequence, and analyze samples without needing to transport them. The MinION sequencer from Oxford Nanopore Technologies (ONT) can be carried easily in a pocket or carryon bag. This avoids complications of challenging transportation of biological samples, highly contagious agents or the requirement of a cold chain. There is the potential for a fast turnaround from sample collection to analysis, allowing for near live-monitoring of outbreak situations, as observed in during the Western African Ebola virus epidemic 2013-2016, or of course the COVID-19 pandemic. Furthermore, multiplexing and the washing and reuse of the most expensive component of sequencing, the flow cells, allowing for cheaper sequencing than other methods. Finally, the sequencer can produce very long reads which improves assembly potential, particularly of highly repetitive genomes.

Whilst it is possible to obtain whole genome sequences of ASFV directly from blood- and tissue extract DNA, the high prevalence of pig DNA and the need for baits or other methods to enrich ASFV DNA render that method inapplicable for high-throughput, fast, sequencing.

Изборът на конкретен метод или платформа за секвениране и изборът на софтуерни инструменти за асемблиране и биоинформатичен анализ на секвенциите зависи основно от **целите, които са поставени, конкретния патоген, времевия интервал, финансовата обезпеченост и ресурсите, които са на разположение**. На схемата по-долу е представен сравнителен анализ на времето от обработка на една постъпила в лабораторията проба, до биоинформатичния анализ и постигане на крайната цел- разчитане на пълния секвениран геном на даден патоген.



Изводите от всички тези изброени проучвания показва, че е **необходима навременна бърза, точна и информативна диагностика, респективно диагностичен**

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136
<http://corhv.government.bg>, corhv@mzh.government.bg
тел. 02/4273056

подход, включващ новите геномни техники и молекулярни диагностични подходи, в комбинация с добра мониторингова стратегия и навременно и точно проведени епизоотологични проучвания, за да може да бъде оценен риска от възникване и разпространение на подобни високопатогенни вирусни заболявания и предприемане на навременни и адекватни мерки за борба с тях.

Изготвил:

Красимира Захариева,

Главен експерт в Дирекция ОРХВ, ЦОРХВ

Използвана литература:

- *African swine fever virus evasion of host defences - L.K. Dixon, M. Islam, R. Nash, A.L. Reis*
- *Genetic and antigenic diversity of African swine fever virus - Alexander Malogolovkina, Denis Kolbasov*
- *Methods for African swine fever diagnosis in clinical and environmental samples - C. Gallardo, P. Sastre, P. Rueda, A.P. Gerilovych, M. Kit, I. Nurmoja and M.F. Le Potier*
- *African swine fever (ASF) diagnosis, an essential tool in the epidemiological investigation - Gallardo C., Fernández-Pinero J., Arias M.*
- *Whole-Genome Sequence of African Swine Fever Virus isolate from India provides insights into diversity and evolution - Sonalika Mahajan, Juwar Doley, Saravanan Subramaniam, Ajay K. Yadav., Seema Rani Pegu, Narayana H. Mohan, Vishal Chander, Karikalan Mathesh, Sukdeb Nandi, Karam Pal Singh, Vivek Kumar Gupta and Gaurav Kumar Sharma*
- *Complete genome analysis of African swine fever virus responsible for outbreaks in domestic pigs in 2018 in Burundi and 2019 in Malawi - Jean N. Hakizimana, Jean B. Ntirandekura, Clara Yona, Lionel Nyabongo, Gladson Kamwendo, Julius L. C. Chulu, Désiré Ntakirutimana, Olivier Kamana, Hans Nauwynck, Gerald Misinzo*
- *Epidemiological analyses of African swine fever in the European Union (November 2018 to October 2019) - European Food Safety Authority (EFSA)*
- *Epidemiological analyses of African swine fever in the European Union (September 2020 to August 2021) - EFSA (European Food Safety Authority)*
- *A Method for the Analysis of African Swine Fever by Viral Metagenomic Sequencing - ChiHai Ji, JingZhe Jiang, YingFang Wei, ZhiYuan Wang, YongJie Chen, ZhanZhuo Mai, MengKai Cai, ChenXiao Qin, Yu Cai, HeYou Yi, Guan Liang, Gang Lu, Lang Gong, GuiHong Zhang and Heng Wang*
- *Whole-Genome Sequence of an African Swine Fever Virus Isolate from the Czech Republic - Jan H. Forth, Leonie F. Forth, Petr Václavěk, Pavel Barták, Dirk Höper, Martin Beer, Sandra Blome*

- *Genetic Characterization and Variation of African Swine Fever Virus China/GD/2019 Strain in Domestic Pigs - Xun Wang, Xiaoying Wang, Xiaoxiao Zhang, Sheng He, Yaosheng Chen, Xiaohong Liu and Chunhe Guo*
- *The first complete genome sequence of the African swine fever virus genotype X and serogroup 7 isolated in domestic pigs from the Democratic Republic of Congo - Patrick N. Bisimwa, Juliette R. Ongus, Lucilla Steinaa, Espoir B. Bisimwa, Edwina Bochere, Eunice M. Machuka, Jean-Baka Domelevo Entfellner, Edward Okoth and Roger Pelle*
- *The first genotype II African swine fever virus isolated in Africa provides insight into the current Eurasian pandemic - Emma P. Njau, Jean-Baka Domelevo Entfellner, Eunice M. Machuka, Edwina N. Bochere, Sarah Cleaveland, Gabriel M. Shirima, Lughano J. Kusiluka, Chris Upton, Richard P. Bishop, Roger Pelle & Edward A. Okoth*
- **STANDARD OPERATING PROCEDURE FOR THE EXTRACTION OF AFRICAN SWINE FEVER VIRUS (ASFV) DNA**
- *Dynamics of African swine fever virus (ASFV) infection in domestic pigs infected with virulent, moderate virulent and attenuated genotype II ASFV European isolates - Carmina Gallardo, Alejandro Soler, Imbi Nurmoja, Cristina Cano-Gómez, Svetlana Cvetkova, Maciej Frant, Grzegorz Woźniakowski, Alicia Simón, Covadonga Pérez, Raquel Nieto, Marisa Arias*
- *Effect of mixing and feed batch sequencing on the prevalence and distribution of African swine fever virus in swine feed - Catherine Grace Elijah, Jessie D. Trujillo, Cassandra K. Jones, Taeyong Kwon, Charles R. Stark, Konner R. Cool, Chad B. Paulk, Natasha N. Gaudreault, Jason C. Woodworth, Igor Morozov, Carmina Gallardo, Jordan T. Gebhardt, Jürgen A. Richt*
- *High Doses of Inactivated African Swine Fever Virus Are Safe, but Do Not Confer Protection against a Virulent Challenge - Estefanía Cadenas-Fernández, Jose M. Sánchez-Vizcaíno, Erwin van den Born, Aleksandra Kosowska, Emma van Kilsdonk, Paloma Fernández-Pacheco, Carmina Gallardo, Marisa Arias and Jose A. Barasona*
- **SOP-ASF-GENOTYPING**
- *No part gets left behind: Tiled nanopore sequencing of whole ASFV genomes stitched together using Lilo - Amanda Warr, Caitlin Newman, Nicky Craig, Ingrida Vendelė, Rizalee Pilare, Lilet Cariazo Cruz, Twinkle Galase Barangan, Reildrin G Morales, Tanja Opriessnig, Virginia Mauro Venturina, Milagros R Mananggit, Samantha Lycett, Clarissa YJ Domingo, Christine Tait-Burkard*
- <https://nanoporetech.com/webinar/on-demand/other-deadly-virus-tiled-amplicon-sequencing-and-assembly-african-swine-fever-virus>
- *Rapid Sequence-Based Characterization of African Swine Fever Virus by Use of the Oxford Nanopore MinION Sequence Sensing Device and a Companion Analysis Software Tool - Vivian K. O'Donnell, Frederic R. Grau, Gregory A. Mayr, Tracy L. Sturgill Samayoa, Kimberly A. Dodd, Roger W. Barrette*
- *Whole-Genome Sequence of an African Swine Fever Virus Isolate from the Czech Republic - Jan H. Forth, Leonie F. Forth, Petr Václavěk, Pavel Barták, Dirk Höper, Martin Beer, Sandra Blome*

- *Genetic Characterization and Variation of African Swine Fever Virus China/GD/2019 Strain in Domestic Pigs* - Xun Wang, Xiaoying Wang, Xiaoxiao Zhang, Sheng He, Yaosheng Chen, Xiaohong Liu and Chunhe Guo
- *The first complete genome sequence of the African swine fever virus genotype X and serogroup 7 isolated in domestic pigs from the Democratic Republic of Congo* - Patrick N. Bisimwa, Juliette R. Ongus, Lucilla Steinaa, Espoir B. Bisimwa, Edwina Bochere, Eunice M. Machuka, Jean-Baka Domelevo Entfellner, Edward Okoth and Roger Pelle
- *The first genotype II African swine fever virus isolated in Africa provides insight into the current Eurasian pandemic* - Emma P. Njau, Jean-Baka Domelevo Entfellner, Eunice M. Machuka, Edwina N. Bochere, Sarah Cleaveland, Gabriel M. Shirima, Lughano J. Kusiluka, Chris Upton, Richard P. Bishop, Roger Pelle & Edward A. Okoth
- *Dynamics of African swine fever virus (ASFV) infection in domestic pigs infected with virulent, moderate virulent and attenuated genotype II ASFV European isolates* - Carmina Gallardo, Alejandro Soler, Imbi Nurmoja, Cristina Cano-Gómez, Svetlana Cvetkova, Maciej Frant, Grzegorz Woźniakowski, Alicia Simón, Covadonga Pérez, Raquel Nieto, Marisa Arias
- *Effect of mixing and feed batch sequencing on the prevalence and distribution of African swine fever virus in swine feed* - Catherine Grace Elijah, Jessie D. Trujillo, Cassandra K. Jones, Taeyong Kwon, Charles R. Stark, Konner R. Cool, Chad B. Paulk, Natasha N. Gaudreault, Jason C. Woodworth, Igor Morozov, Carmina Gallardo, Jordan T. Gebhardt, Jürgen A. Richt
- <https://www.youtube.com/watch?v=LRORhnpOhMU>
- *A Deep-Sequencing Workflow for the Fast and Efficient Generation of High-Quality African Swine Fever Virus Whole-Genome Sequences* - Jan H. Forth, Leonie F. Forth, Jacqueline King, Oxana Groza, Alexandra Hübner, Ann Sofie Olesen, Dirk Höper, Linda K. Dixon, Christopher L. Netherton, Thomas Bruun Rasmussen, Sandra Blome, Anne Pohlmann and Martin Beer
- <https://www.eurekalert.org/news-releases/672975>
- *Genotyping field strains of African swine fever virus by partial p72 gene characterisation* - A. D. S. Bastos, M.-L. Penrith, C. Crucière, J. L. Edrich, G. Hutchings, F. Roger, E. Couacy-Hymann & G. R. Thomson - <https://link.springer.com/article/10.1007/s00705-002-0946-8>
- *Performance Characteristics of Real-Time PCRs for African Swine Fever Virus Genome Detection—Comparison of Twelve Kits to an OIE-Recommended Method* - Jutta Pikalo, Tessa Carrau, Paul Deutschmann, Melina Fischer, Kore Schlottau, Martin Beer and Sandra Blome