

Hungary-Slovakia-Romania-Ukraine

ENI CBC Programme 2014-2020

„BioSecurity– közös vészhelyzeti fellépés a veszélyes és elterjedt fertőzések azonosítása esetén a Kárpáti régióban” projekt

HUSKROUA/1901/8.1/0010



Összefoglalás

„A magyar molekuláris biológiai vizsgálatok bemutatása, vaddisznóból, élelmiszerekből vett minták alapján”

Készítette:

dr. Kecskeméti Sándor

A magyar molekuláris biológiai vizsgálatok bemutatása, vaddisznóból, élelmiszerekből vett minták alapján

Az afrikai sertéspestis a házisertés és az európai vaddisznó hevenyen lezajló, lázas állapottal, vérzésekkal járó, az esetek jelentős részében elhullással végződő betegsége, melyet először 1921-ben Kenyában írtak le és innen terjedt szét Afrikába. Afrikából többször behurcolták Európába, Közép és Dél-Amerikába, majd 2007-ben Grúziába, ahonnan kiindulva napjaink legnagyobb világjárványát okozza. Az afrikai sertéspestis vírus az Asfarviridae család, Asfvirusus generájának tagja, bonyolult felépítésű, nagy, többrétegű, ikozahedrális szimmetriájú, burkos vírus. Természetes rezervoárjai az Ornithodoros kullancsok és az afrikai vadon élő sertések.

A vírus környezeti hatásokkal szemben ellenálló, a fertőzés terjesztése szempontjából különösen fontos a nyers hús, a fagyasztott hús, a nyers, füstölt, sózott, pácolt húskészítmények, a nem vagy gyengén főzött élelmiszerek, a moslék, az ételmaradék, a konyhai hulladék. A vírustörzsek virulenciájuk, genetikai tulajdonságaik és szerológiai viselkedésük alapján különbözőképpen csoportosíthatók.

Magyarországon az első esetet 2018-ban állapították meg egy heves vármegyei elhullott vaddisznóban. Az izolátum 99-100 % azonosságot mutatott a Georgia 2007 törzssel, a vírus a vaddisznók között fokozatosan terjedt, egészen Fejér vármegyéig jutott. A fejér vármegyei eset óta nem terjedt át fertőzés újabb vármegyék területére, ezért enyhítettek a kockázati besoroláson, míg más körzeteket kivontak a korlátozás alól. Magyarországon az afrikai sertéspestist házisertésekben még nem állapították meg.

A vírus gazdái a varacskos disznó (*Phacochoerus africanus*, warthog), az erdei óriásdisznó (*Hylochoerus meinertzhageni*, giant forest hog), a bojtosfülű disznó (*Potamochoerus* sp, bushpig), az Ornithodoros kullancsok, az európai vaddisznó és a házisertés. A fertőzés az állatok, állományok között a fertőzött, beteg állattal való közvetlen érintkezéssel, vagy közvetett úton történhet. A szervek magas titerben tartalmazzák a vírust, 1 gramm lépszövet akár 10^{12} , 1 ml vér 10^8 vírust is tartalmazhat. A fertőzés járványtana területenként eltérő, különböző fertőzési ciklusokat (afrikai ciklus, kullancs-házisertés ciklus, házisertés ciklus) különböztetnek meg. 2014-től Kelet-Európában egy az eddigiektől eltérő, az európai vaddisznó élőhelyekhez köthető ciklust is megfigyeltek. A járvány „normál esetben” a vaddisznók között lassan terjed (1-2 km/hó). Házisertések között, illetve vaddisznóról házisertésre emberi közreműködéssel, a járványvédelmi szabályok megszegésével terjed. A fertőzés hatására keletkezett ellenanyagok vírussemlegesítő hatása nem megfelelő. Az intenzív vakcina fejlesztési kísérletek ellenére hatékony és biztonságos kereskedelmi vakcina jelenleg még nem áll rendelkezésre.



**PARTNERSHIP
WITHOUT BORDERS**



Az Európai Unió társfinanszírozásával készült.

A magas virulenciájú törzsek a betegség túlheveny és heveny, a közepes virulenciájú törzsek a betegség heveny és félheveny, míg az alacsony virulenciájú törzsek a betegség idült formáját idézik elő. A heveny formában az állatok, étvágytalanok, bágyadtak, 40-42 °C a testhőmérsékletük. A bőr kipirul, cianotikussá válik, apró elhalások és bőr alatti vérzések láthatók. A heveny formában szenvedő állatok 90-100 %-a az első tüneteket követő 1 héten belül elhullik. A betegsége nagyon jellegzetes a hyperaemiás lépduzzanat. Vérzések keletkezhetnek a nyirokcsomókban, a vesék kéregállományban, a húgyhólyag nyálkahártyájában. Az alacsony virulenciájú törzsek a betegség jellegtelen tünetekkel járó idült formáját okozzák.

Az afrikai sertéspestist nem lehet klinikai és/vagy kórbonctani vizsgálattal egyértelműen megállapítani, ezért a laboratóriumi vizsgálatok nélkülözhetetlenek a pontos kórjelzés és a sikeres leküzdési intézkedések meghozatala érdekében. A betegség kórokozójának kimutatására direkt, a keletkezett ellenanyagok kimutatására indirekt módszerek állnak rendelkezésünkre. A betegség leküzdése szempontjából a fertőzést követő néhány nap múlva a viraemia kezdetén a vírus kimutatásának, míg a fertőzés későbbi szakaszában az ellenanyagok kimutatásának van nagyobb jelentősége. A vírus pozitívitas ellenanyag negatívítással a jelenlegi, friss fertőződést, a vírus pozitívitas és az ellenanyag pozitívitas a folyamatban lévő fertőződést, míg az ellenanyag pozitívitas vírus negatívitas a múltbeli fertőződést jelenti.

Az afrikai sertéspestis megállapítása/kizárása érdekében az Európai Unió Afrikai Sertéspestis Referencia Laboratóriuma és a WOAHI Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2021 Chapter 3.9.1 által ajánlott mintákat kell megvizsgálni. A kórjelzéshez mandula, áll alatti, garat mögötti, fültő alatti, bélfodri nyirokcsomó, lép, vese, tüdő, csípőbél, csőves csont, szegycsont, natív vérminta és alvadásgátolt vérminta (EDTA) laboratóriumi vizsgálata szükséges. Házisertések esetében javasolják a bal bordaív mentén ejtett vágással a lép, illetve egy részének kiemelését, vaddisznók esetében a lövési csatornából tamponnal történő mintavételt is. A felületes lágyéki nyirokcsomók, a Whatmann 903 szűrőpapíron beszárított vérminták „dried blood spot sampling”, vagy FTA kártyák (Flinders Technology Associates) és beszárított tamponminták is alkalmasak lehetnek a vizsgálatokra. Az afrikai sertéspestisnek nincs közegészségügyi vonatkozása, ezért az élelmiszerminták vizsgálatának elsősorban tudományos jelentősége van.

A vírus kimutatás módszerei

A betegséget okozó Asfivirus izolálható, a vírus a megbetegedett állat szerveiből immunfluoreszcenciás módszerrel, a vírus antigénjei antigénkimutató ELISA-val, gyorsesztekkel, (pen-side teszt, lateral flow devices) a vírus nukleinsav valós idejű polimeráz



**PARTNERSHIP
WITHOUT BORDERS**



lánreakcióval (real-time PCR) és gél alapú PCR reakcióval is kimutatható. A hemadszorpcióval, vagy immunfluoreszcens festéssel kiegészített vírusizolálás érzékeny megerősítő módszer a fertőzőképes vírus kimutatására, azonban nagyszámú rutinvizsgálatra alkalmatlan. A mindennapi laboratóriumi diagnosztikában a nagyfokú érzékenység és specificitás, az automatizálhatóság és a tömeges vizsgálati lehetőség miatt a valós idejű (real-time) PCR terjedt el.

Az ASP vírusának kimutatása real-time PCR módszerrel

A PCR vizsgálat néhány óra (maximum egy munkanap) alatt elvégezhető, ezáltal a járványvédelmi intézkedések késlekedés nélkül meghozhatók. Nem szükséges a vírus szaporítása, azonban különálló helyiségeket, speciális műszerekkel felszerelt laboratóriumot és szakképzett személyzetet igényel. PCR-rel mind a 24 genotípusba tartozó törzs kimutatható. A PCR még akkor is pozitív lehet, ha vírusizolálással már nem mutatható ki fertőző vírus. A vizsgálatok költségei csökkenthetők a minták bizonyos mértékű elegyítésével (poolozásával), anélkül, hogy a reakció érzékenysége számottevően csökkenne.

A PCR nagyfokú érzékenysége miatt különös figyelmet kell fordítani a téves pozitív reakciókra és a téves negatív eredményekre is. A téves pozitívítás származhat az ASP vírust tartalmazó mintából, a nukleinsav kivonási kontrollból, vagy a pozitív kontrollból kereszt-kontamináció, a laboratóriumban szennyeződött reagensektől, eszközöktől. A téves pozitívítás elkerülése érdekében a PCR során a vizsgálat különböző szakaszait egymástól jól elkülöníthető helyiségekben kell végezni, a munkafolyamatokat egy irányba a DNS-sel való terheltség növekedésének megfelelően kell szervezni. Egyszerhasználatos kesztyűt, egyszerhasználatos steril szűrős pipettahegyeket és általában steril egyszerhasználatos eszközöket kell használni. A master mix összeállítására szolgáló helyiségben tiszta (más munkafolyamat során nem használt) védőruházatot kell használni. Az eszközöket, berendezéseket, felületeket folyamatosan fertőtleníteni, dekontaminálni kell. Téves pozitív eredményre vezethetnek a gyakorlatban (helyszínen) történő, esetenként tömeges mintavétel során elkövetett mintavételi hibák. Téves eredményeket (de nem téves PCR reakciót!) okozhatnak a mintavétel során a mintavevő ruházatának, kesztyűjének szennyeződése, a használt eszközök (kés, olló, szike) dekontaminációjának elmaradása, a helytelen mintavételi technika.

A fertőzés kórjelzése szerológiai módszerekkel

A fertőzésen átesett állatokban a ellenanyagok jelennek meg, melyek hosszú ideig, akár éveken keresztül is kimutathatók. Európában vakcina, illetve vakcinázás hiányában a szeropozitivitás egyértelmű áthangolódást jelent. Az ellenanyagok ELISA-val, immunoblott technikával, indirekt fluoreszcens ellenanyag vizsgálatlaltal, indirekt immunoperoxidase teszttel és

ellenanyag gyorsesztekkel mutathatók ki. A virulens, II genotípusú vírus okozta fertőzés heveny megbetegedés, ezért a jelenlegi járvány során az állatok az ellenanyagok megjelenése előtt általában elhullanak. A gyakorlatban az egyszerűség, a gyorsaság és az automatizálhatóság miatt leginkább az ELISA eljárások terjedtek el.

A tanulmányterv 5 mellékletében részletezi a vizsgálatok legfontosabb lépéseit és az alkalmazott fertőtlenítő eljárásokat. (1. számú melléklet: Minta előkészítés, homogenizálás, inaktiválás, heated-off board lysis nukleinsav kivonás (IndiMag Pathogen kit KingFisher heated OFF-BOARD lysis nukleinsav kivonáshoz), 2. számú melléklet: Az ASP vírusának kimutatása real-time PCR módszerrel (Virotype ASFV 2.0 PCR Kit), 3. számú melléklet: Az afrikai sertéspestis vírusával szembeni ellenanyagok kimutatása ELISA-val (Ingezim PPA Compac K3 ELISA teszt), 4. számú melléklet: Az afrikai sertéspestis vírusával szembeni ellenanyagok kimutatása ELISA-val (ID Screen® African Swine Fever Indirect Confirmation Test), 5. számú melléklet: Fertőtlenítés a Debreceni Immunológiai, Viroológiai és TSE Laboratóriumban

A tanulmányterv részletesen bemutatja az afrikai sertéspestis vizsgálatával foglalkozó laboratóriumokra vonatkozó munkaszervezési és biológiai biztonsági szabályokat (a laboratórium elrendezése és felszereltsége, fertőtlenítés, bejutás a laboratóriumokba, az ASP laboratórium működésére vonatkozó speciális szabályok). A kórokozó megbízható inaktiválásához a mintát termoblokkban 72 °C 30 percig hőkezeljük, majd az átadó ablakban fertőtlenítő oldatban 15 percre alámerítve juttatjuk ki.

A tanulmányterv ismerteti az afrikai sertéspestissel, annak kórjelzésével, a laboratóriumi vizsgálatokkal kapcsolatos európai uniós és magyar jogszabályokat, utasításokat, előírásokat.

Hungary-Slovakia-Romania-Ukraine

ENI CBC Programme 2014-2020

„BioSecurity– közös vészhelyzeti fellépés a veszélyes és elterjedt fertőzések azonosítása esetén a Kárpáti régióban” projekt

HUSKROUA/1901/8.1/0010



TANULMÁNYTERV

„A magyar molekuláris biológiai vizsgálatok bemutatása, vaddisznóból, élelmiszerekből vett minták alapján”

Készítette:

dr. Kecskeméti Sándor



**PARTNERSHIP
WITHOUT BORDERS**



Az Európai Unió társfinanszírozásával készült.

A magyar molekuláris biológiai vizsgálatok bemutatása, vaddisznóból, élelmiszerekből vett minták alapján

- Az afrikai sertéspestis (világ) járványok rövid áttekintése, a kórokozó felépítésének ismertetése. A vizsgálatok végzésére illetékességgel és engedéllyel rendelkező intézmények.
- A II genotípusú vírus okozta járvány 2007-től napjainkig a világban, Európában és Magyarországon. A kórokozó terjedése, járványtan, fertőzési ciklusok.
- A laboratóriumi diagnosztikai lehetőségek áttekintése: vírusizolálás, antigén kimutatás, PCR, szekvenálás, ELISA.
- Diagnosztikai kézikönyv és a készenléti terv előírásai.
- Mintavételi lehetőségek vaddisznókból, az egyes minták előnyei, hátrányai. Kísérőirat, pontos azonosítás, visszakereshetőség.
- Csomagolás, mintavételi, csomagolási hibák.
- Szerológiai kórjelzés elmélete és gyakorlata.
- Virologiai kórjelzés lépései.
- Reakcióelegy összemérés, master mix összeállítás, reakciók értékelése, az eredmények közlése.
- Az afrikai sertéspestis vizsgálatával foglalkozó laboratórium működtetésének főbb munkaszervezési és biológiai biztonsági elemei.
- Részvétel, javaslatok a kerekasztal megbeszéléseken.
- Oktatás, képzés, a magyar laboratóriumi vizsgálatok bemutatása (online vagy személyesen).
- Tapasztalatok átadása az új berendezések beüzemeléséhez (Ungvár, Nagybánya).
- Előadások megtartása felkérés alapján (online vagy személyesen).
- A tanulmányokból összefoglaló anyag készítése, maximum 2-3 oldalas terjedelemmel a honlapon való megjelenítéshez.
- Törvények, rendeletek, utasítások felsorolása.

Az afrikai sertéspestis magyarországi vizsgáló laboratóriumai

Az **Afrikai Sertéspestis Nemzeti Referencia Laboratórium (NRL)** a NÉBIH Állategészségügyi Diagnosztikai Igazgatósága Budapesti Laboratóriuma (NÉBIH ÁDI, 1143 Budapest, Tábornok u. 2.). Az afrikai sertéspestis gyanúja esetén a NÉBIH ÁDI Kaposvári Állategészségügyi Diagnosztikai Laboratóriuma a vizsgálati anyagot a NÉBIH ÁDI Budapesti Laboratóriumába küldi. A NÉBIH ÁDI Debreceni telephelyének laboratóriumai (Debreceni Kórbonctani és Bakteriológiai Laboratórium és a Debreceni Immunológiai, Virologiai és TSE Laboratórium) kórtani és PCR vizsgálatokat is végeznek. A PROPHYL Állategészségügyi, Diagnosztikai, Kutató és Szolgáltató Korlátolt Felelősségű Társaság telephelyén működtetett szolgáltató laboratórium csak a szállítás előtti vérminták PCR vizsgálatát végzi, ASP gyanú esetén továbbítja az ÁDI-ba a vizsgálati anyagot.

Az ÁDI területi laboratóriumai részt vesznek az afrikai sertéspestis felderítésére irányuló szerológiai vizsgálatok végzésében.

A Nemzeti Referencia laboratórium a vizsgálatok kedvezőtlen eredményéről haladéktalanul értesíti:

- az Országos Főállatorvost,
- az Országos Járványvédelmi Központot,
- a NÉBIH ÁÁI igazgatóját,
- a beküldés helye szerint illetékes vármegyei főállatorvost, illetve HJK-t,
- a beküldő állatorvost.

A betegség hatósági megállapítása, illetve a laboratóriumi vizsgálatok eredményeinek értékelése

Az elvégzett laboratóriumi vizsgálatok alapján az ASP hatósági megállapítása a járási főállatorvos feladata. Az adott területen való első megállapításhoz az NRL megerősítő vizsgálata szükséges. A laboratóriumi vizsgálatok értékelését és a betegség hatóságilag történő megállapítását a készenléti tervben részletezettek szerint kell elvégezni (86).

Abban az esetben, ha a vármegyében még nem került megállapításra az ASP elsődleges kitörése, vagy az ASP-re gyanús állat -a járványügyi nyomozás során- nem hozható kapcsolatba más vármegyében megállapított kitöréssel, akkor a PCR pozitív



**PARTNERSHIP
WITHOUT BORDERS**



eredményt a szekvenálás eredményének ismertté válásáig, vagy a vírusizolálás pozitív eredményéig az ASP hatóságilag megerősített gyanújának kell tekinteni és ennek megfelelően kell eljárni.

A szerológiai vizsgálatok pozitív eredményét minden esetben az ASP hatóságilag megerősített gyanújának kell tekinteni és ennek megfelelően kell eljárni.

Afrikai sertéspestis

(Az afrikai sertéspestis (világ) járványok rövid áttekintése, a kórokozó felépítésének ismertetése, ellenállóképesség, fertőtlenítőszeres, a vírustörzsek csoportosítása, a betegség korai története, a betegség napjainkban, a II genotípusú vírus okozta járvány 2007-től napjainkig a világban, Európában és Magyarországon, a kórokozó terjedése, járványtan, ízeltlábúak szerepe, fertőzési ciklusok, vírushordozás, klinikai tünetek, kórbonctani elváltozások, elkülönítő kórjelzés.)

Az afrikai sertéspestis a házisertés és az európai vaddisznó hevenyen lezajló, lázas állapottal, vérzésekkel járó, az esetek jelentős részében 1-2 héten belül elhullással végződő betegsége. A betegséget először 1921-ben Kenyában írták le és innen terjedt szét Afrikába, ahol mára több mint 35 ország vált fertőzötté. Afrikából többször behurcolták Európába, Közép és Dél-Amerikába, majd 2007-ben Grúziába, ahonnan kiindulva napjaink legnagyobb világjárványát okozza (75, 48).

Általános virológiai ismertetés

Az afrikai sertéspestis vírus az Asfarviridae család, Asfivirusus generájának tagja (7), bonyolult felépítésű, nagy, többrétegű, ikozahedrális szimmetriájú, burkos vírus. 170-193 kb. méretű duplaszálú DNS-ből álló genomja 150-160 ORF-et tartalmaz (9, 24, 67, 106). A strukturális fehérjék mellett (kb. 54) a vírusszaporodás során nagyszámú nem strukturális fehérje is keletkezik. Ezek a nukleotid anyagcseréhez, a DNS átíráshoz, a replikációhoz szükségesek, de a vírus genom kódol különböző javító enzimeket, egyéb anyagcsere enzimeket, a gazdasejt-gazdaszervezet működését befolyásoló fehérjéket, az interferon termelődést és az immunválaszt módosító fehérjéket is (CD2v lectin-like protein fehérje).

A vírus a monocyta/makrofág sejtek citoplazmájában szaporodik, természetes rezervoárjai az Ornithodoros kullancsok és az afrikai vadon élő sertések. Az ASPV az egyetlen DNS vírus, amit ízeltlábúak (a Közép-Kelet Európában nem honos lágyszárú kullancsok) is terjeszthetnek (Afrikában az Ornithodoros moubata, Európában/Ibériai félszigeten az Ornithodoros erraticus). A genom két végén lévő variábilis régióban található multigén családba tartozó, gyakran több példányban is előforduló géneknek (MG 100, MG 110, MG 300, MG 360, MG 506/530) a patogenitás és a virulenciában van meghatározó szerepük (24).

Ellenállóképesség

A vírus különböző anyagokban (élő állatokban és ízeltlábú vektorokban, állati szövetekben és húsokban, húskészítményekben, váladékokban, fertőzött környezetben) való kimutathatóságáról, illetve a vírus túlélési idejéről az EFSA Panel



**PARTNERSHIP
WITHOUT BORDERS**



on Animal Health and Welfare és Wales 2021 készített irodalmi összefoglalást (32, 104). A vírus környezeti hatásokkal szemben ellenálló: bélsárból 11 napig, fertőzött istállókörnyezetből 30 napig, csontos húsból 4 °C-on 150 napig, rothadó vérből 15 hétig, vérben 4 °C-on 18 hónapig, bomló állati hullákban 3-5 hétig, Serrano sonkából 140 napig, Pármai sonkából 399 napig izolálható, fagyasztott húsokból akár 1000 napig is kimutatható. (29, 31, 35, 104). A fentiek miatt a fertőzés terjesztése szempontjából különösen fontos a nyers hús, a fagyasztott hús, a (nemzetközi turistaforgalomban közkedvelt) nyers, füstölt, sózott, pácolt húskészítmények, a nem vagy gyengén főzött élelmiszerek, a moslék, az ételmaradék, a konyhai hulladék. A vírus 56 °C-on 70 perc; 60 °C-on 20 perc alatt inaktiválható, 70 °C-on néhány perc alatt elpusztul, pH <3,9 és >11,5 között stabil, a lipoprotein burok miatt zsírolószerekre (éter és kloroform) érzékeny.

Fertőtlenítőszer

Az ASP elleni fertőtlenítésre szerves és szervetlen savak, lúgok (NaOH), aldehidek (glutáraldehid), klór és klórtartalmú szerek (NaClO), jódtartalmú szerek, oxidáló szerek (hidrogén peroxid gőz, kálium peroxid, Virkon), fenol tartalmú szerek és kvaterner ammónium sók, illetve ezek kombinációi (Virocid, Perfect kombicid) vehetők igénybe. A kémiai szerek hatását a környezet szerves anyag tartalma, a fertőtlenítendő felület minősége, a pH, a hőmérséklet, az alkalmazott koncentráció és a behatási idő lényegesen befolyásolhatja (13, 104). A WOAH ajánlása ASP ellen: nátrium hidroxid 0,8 % 30 percig, nátrium-hipoklorit 0,03 és 0,5 % közötti szabad klórtartalommal 30 percig, orto-fenilfenol 3,0 % 30 percig, formalin, 0,3 % 30 percig (83). Az ASP ellen hatékony Magyarországon engedélyezett fertőtlenítőszer listája a <https://portal.nebih.gov.hu/documents/10182/902001/ASP+ellen+ajanlott+fertotlenitoszerek.xlsx> oldalon található. Az ÁDI Debreceni Immunológiai, Virologiai és TSE Laboratóriumában fertőtlenítésre a Virocid 1: 100 oldatát használjuk (26).

A vírustörzsek csoportosítása

A törzsek virulenciája széles határok között változik, megkülönböztetnek magas: Lisboa60 (L60), Benin 97/1, Litvánia LT14/1490, közepes: Málta 78, Hollandia 1986, Portugália 1960, Dominikai Köztársaság és alacsony: NH/P68, OURT88/3 (Portugália 1968, 1988, Kína 2021), BA71V (Spanyolország 1971 VERO), Brazília 1978 virulencia típusokat. Vannak a természetben attenuálódott Lv17/WB/Rie1 (nem HAD) Lettország 2017 és mesterségesen attenuált törzsek ASFV-G-DI177L (virulencia delecio) is (88). Korábban alacsony virulenciájú vírusokat csak az endémiásan fertőzött területeken (Afrika, Ibériai félsziget) mutattak ki, azonban a legújabb adatok

szerint a balti államokban (különösen Észtországban) is egyre nagyobb számban jelennek meg túlélő egyedek, mely az alacsony virulenciájú vírusok megjelenésére utal (111).

Genetikai alapon a major kapszid proteint (p72) kódoló B646L gén C-terminális vége alapján 24 genotípust különböztetnek meg (74, 93). A genotípusokon belül a különböző genetikai elemek vizsgálatával további tipizálás is végezhető. A B602L gén középső variábilis régiójában (CVR) lévő ismétlődő szekvenciák alapján (TRS) a törzsek 31 típusba (80), az I73R és I329L gének közti intergenikus régióban a GGAATATATA szekvenciák inzerciója alapján négy IGR variánsba sorolhatók (45). Az *O174L* (DNS polymerase PolX gene) és a *K145R* génrégióban előforduló TRS, illetve SNP variánsok, az MGF 505-9R/MGF505-10R gének közötti variánsok és az *I329L* és *I215L* gének közötti variánsok is megkülönböztethetők. A törzsek között további különbségek tehetők az EP402R (CD2v fehérjét kódoló) és az E183L (p54) gének vizsgálatával (46, 95).

Hemadszorpció gátlás alapján a törzsek 8 szerocsoportba (1-8) sorolhatók. A jelenlegi eurázsiai járványt a 8. szerocsoportba tartozó vírusok okozzák (71). A szerológiai specificitás genetikai alapjait a CD2v és a C-type lectin génekhez kapcsolják (70, 71, 100).

A betegség korai története

A vírust először Kelet-Afrikában, Kenyában írták le a telepések sertésállományaiban, majd megjelent Dél-Afrikában is és fokozatosan elterjedt a kontinensen, azonban 1957-ig Afrikán belül maradt (89).

Napjainkban Afrika Szaharától délre eső vidékein endémiásan előfordul valamennyi genotípus (1-24), egyes területeken a vágóhidra szállított házisertések 54 %-a is szeropozitív és 12 %-a vírus pozitív (PCR) is lehet (11). 1957-ben Angolából érkezett hajóról származó ételmaradékkal bekerült Portugáliába. A közel 100 %-os mortalitással járó járványt sikeresen felszámolták, majd három év múlva ismét behurcolták, ekkor már Portugálián kívül Spanyolországban és Franciaországban is elterjedt. 1971 és 1983 között -három behurcolás eredményeként- megjelent Kubában, a Dominikai Köztársaságban, Haitin és Brazíliában is. 1978-ban sertések takarmányozására használt fertőzött élelmiszerhulladékkal eljutott Szardínia szigetére is, ahol a folyamatos leküzdési intézkedések ellenére még napjainkban is endémiás (76).

Afrikán kívül csak két genotípus fordult elő. Korábban sporadikusan Afrikán kívül is megjelent az I genotípus (Portugália, Spanyolország, Közép- és Dél-Amerika, Szardínia), míg napjainkban a Kelet-Afrikából (Mozambik, Malawi, Zambia, Tanzánia, Madagaszkár) Grúzián át indult és egész Euráziában elterjedt a II genotípus (81). 2021-ben Kínában beszámoltak az I

genotípusú, alacsony virulenciájú törzsek feltűnéséről, sőt az ilyen és a II genotípusú törzsek közti rekombinánsok is megjelentek (33, 81).

A betegség napjainkban, az ASPV II genotípus megjelenése

1998-ban Kelet-Afrikában (Madagaszkár) új afrikai sertéspestis kitérőket figyeltek meg (69), ahová valószínűleg Mozambikból került át a vírus. 2007 áprilisában a Grúziai Poti kikötője környékén tapasztaltak a házisertések között afrikai sertéspestisre utaló tüneteket, melyek június 05-én laboratóriumi vizsgálatokkal is igazolódtak. A vírus eredete ebben az esetben is feltételezhetően a hajókról származó fertőzött élelmiszerhulladék volt (95). Ezt követően a vírus átterjedt a kaukázusi régióra (Örményország, Azerbajdzsán), elérte Oroszországot és kimutatták vaddisznókból is (49). Oroszországból a vírus nyugati irányba terjedt, Ukrajnán, Fehéroroszországon át 2014-ben elérte az Európai Unió keleti, majd középső és nyugati részét. Napjainkra 15 EU tagország (Bulgária, Belgium, Csehország, Németország, Olaszország, Lettország, Litvánia, Észtország, Lengyelország, Románia, Szlovákia, Horvátország, Magyarország, Görögország, Svédország) és 6 nem EU tagország (Fehéroroszország, Moldova, Észak-Macedónia, Szerbia, Ukrajna, Bosznia-Hercegovina) fertőződött. Az Európa jelentős részén előforduló vírus az egyre intenzívebb leküzdési intézkedések ellenére is folyamatosan terjed.

2018 augusztusában a betegség a világ legnagyobb sertéstermelőjéhez, Kínába is eljutott (110) és rendkívül gyors ütemben mára több ázsiai országban is elterjedt (4). Közel negyven év után 2021-ben ismét eljutott Közép-Amerikába a Dominikai Köztársaságba és Haitira is. Így az elmúlt 25 évben az afrikai sertéspestis soha nem látott elterjedtségre és jelentőségre tett szert. (15). Időközben a II genotípusú a vírust elhurcolták az addig még nem fertőzött dél-afrikai országokba (Tanzánia) és nyugat-afrikai (Nigéria) területekre is (55).

Hat genomrégió kombinált elemzésével az Európában előforduló II genotípusú vírusokat 24 csoportba sorolták, a legnagyobb csoport az izolátumok 50,3 %-át tartalmazta, a legnagyobb variabilitást (9 variáns) a lengyel vírusok között figyeltek meg (46).

Az afrikai sertéspestis járványtana

A vírus gazdái a varacskos disznó (*Phacochoerus africanus*, warthog), az erdei óriásdisznó (*Hylochoerus meinertzhageni*, giant forest hog), a bojtosfülű disznó (*Potamochoerus* sp, bushpig), az *Ornithodoros* kullancsok, az európai vaddisznó és a házisertés.

A fertőzés az állatok, állományok között a fertőzött, beteg állattal, (fertőzött vaddisznóval, illetve fertőzött vaddisznó tetemmel, annak vérével) való közvetlen érintkezéssel, vagy közvetett úton történhet. A vírus nagyfokú ellenállóképesége miatt szinte minden eszközzel, ragályfogó tárggyal terjeszthető: cipő, ruha, állatszállító járművek, egyéb járművek, állatrakodó, állattartási eszközök, hús, sonka, kolbász, szalámi, szalonna, ételmaradék, szendvics, konyhai hulladék, mosogatólé, moslék, fertőzött fű, zöldtakarmányok, alomszalma, gabona magvak, sertés eredetű takarmány kiegészítők, fertőzött hígtrágya, vérrel szennyezett tű, kés, trófea. Ismeretes, de alárendelt jelentőségű az aerogén (istálló belüli) (85) terjedés. Afrikában és Dél-Európában különösen fontos szerepe van bizonyos kullancsoknak (*Ornithodoros* sp). Bizonyították az ondóval való vírusürítést és a mesterséges termékenyítéssel történő vírus terjesztést is (41).

A szervek magas titerben tartalmazzák a vírust. 1 gramm lépszövet akár 10^{12} , 1 ml vér 10^8 vírust is tartalmazhat. Az 50 % fertőző dózis (ID_{50}) száraz takarmánnyal 10^4 , folyadékokkal csak 10^2 , míg intramusculárisan még alacsonyabb csak 10^1 TCID₅₀ (79), így 1 ml viraemiás állatból származó vér akár 50 millió állat fertőzéséhez elegendő. A vírus a fertőződést követő 2-5 nap múlva megjelenik a véráramban, magas titerben ürül a váladékokkal, vérrel, a vírus a beteg állat „húsában” jelen van, fagyasztva meghatározhatatlanul hosszú ideig megőrzi fertőzőképességét. A „hús” a helyi és a távoli terjesztésben döntő fontosságú, a fagyasztott hús még évek múlva is új járványokat képes előidézni. Az orrváladékban, nyálban már a véráramban való megjelenés és a klinikai tünetek előtt is kimutatható a vírus, mennyisége viszonylag alacsony, de elég a fertőzés továbbadásához.

Hőmérséklettől függően hosszú ideig, fagyott hullában hónapokig életben maradhat a vírus, átteelve -még élő vaddisznó hiányában is- tavasszal új fertőzési ciklus indulhat el. Ezért is különösen fontos a hullák, a belsőségek, zsigerek összegyűjtése, megsemmisítése és az élőhely vírusterhelésének csökkentése. A vírus DNS is és a vírus is kimutatható az (elbomlott, fertőzött) vaddisznó hulla alatti talajból is. A felezési idő környezeti hőmérséklettől (a proteázoktól és a lipázoktól) függ, de a vizeletben hosszabb, mint bélsárban.

Az izeltlábúak szerepe a vírus terjesztésében



**PARTNERSHIP
WITHOUT BORDERS**



Az Európai Unió társfinanszírozásával készült.

A valódi biológiai vektorként szereplő vérszívó ízeltlábúak táplálkozásuk során felveszik a fertőzött vért, a vírus bennük szaporodik (bél, nyálmirigy, petefészek) és egy újabb vérszívás után továbbadják azt. A mechanikai vektorokban a vírus nem szaporodik, esetükben a szájszervek, az emésztőcső első szakasza kontaminálódik a vírussal, amit egy későbbi vérszívás, táplálkozás során továbbadhatnak. A passzív vírusátvitel során az is előfordulhat, hogy az ízeltlábú teste szennyeződik a vírussal, amittől a sertések fertőződnek (18).

A döglégyek (Selymes döglégy, *Lucilla sericata* és a Kék dongólégy, *Calliphora vicina*) nyüveiben élő vírust nem találtak, de a vírus DNS-t PCR-rel kimutatták. Mivel a vaddisznó gyakran kutat a nyüvek után, ezért a nyüvek megnövelik a fertőzött hullákkal való érintkezés esélyét. Az állatok istállójában és a környékén előforduló szuronyos istállólégy (*Stomoxys calcitrans*) szájszervében, emésztőcsatornájában 48 óráig életképes a vírus (87), ezért a szuronyos istállólégy a legyek szűrésével, vagy a legyek lenyelésével főként állományon belül hozzájárulhat a vírus terjesztéséhez. A bögyölyfélék (*Tabanidae*) is terjeszthetik a vírust, annak ellenére, hogy bennük kisebb a vírus túlélési esélye (10).

A szúnyogokból (*Culex pipiens*) PCR-rel nem tudtak nukleinsavat kimutatni, bár mechanikai átvivő szerepük nem zárható ki. Nagyüzemi állattartási körülmények esetén a szúnyogok szerepe elhanyagolható (107). Az *Ixodes*, *Dermacentor* kullancsokban sem sikerült a vírusszaporodás jeleit kimutatni (56). A házilégy, a tetvek, a rühatkák és egyéb ízeltlábúak szerepe még nem kellően tisztázott (18).

A fertőzés járványtani ciklusai

A fertőzés járványtana területenként eltérő, különböző fertőzési ciklusokat különböztetnek meg.

Az afrikai ciklus (sylvaticus, eredeti, természetes) során az *Ornithodoros* kullancsok terjesztik a vírust a vadon élő afrikai disznófélékre, elsősorban a varacskos disznóra (*Phacochoerus africanus*). A fertőzött kullancs csípése után a 3 hónaposnál fiatalabb állatokban átmeneti viraemia (11 napig, maximum $10^{3,7-4,0}$ HAD_{50/ml}) alakul ki, de a fertőzés az esetek jelentős részében tünetmentes, majd ezek a viraemiás állatok a kullancsok újabb nemzedékének adják át a vírust (101). A kullancs akár 3 évig is fertőzőképes lehet, a varacskos disznó 25 hétig (akár élete végéig) is fertőzött maradhat. A vírus a nyirokcsomókban akár 10^5 - 10^6 HAD_{50/g} titert is elérhet, azonban a szervezetből nem ürül, így a felnőtt varacskos disznók sem horizontálisan, sem vertikálisan sem terjesztik a vírust. A házisertések fertőződését a varacskos disznóval való

közvetlen érintkezéssel nem igazolták, azonban a fertőzött varacskos disznó szöveteinek feletetése után a fertőzés kialakult (108).

A kullancs-házisertés ciklus során a fertőzött kullancsok, időnként átadhatják a vírust a házisertéseknek (vadon élő sertéseknek) is (Afrika, Ibériai félsziget) és a viraemiás házisertéseken táplálkozva vissza is fertőződhetnek. Tekintettel arra, hogy az Ornithodoros kullancsok az Ibériai félsziget kivételével nem fordulnak elő Európában, ezért a jelenleg zajló járvány során az ilyen jellegű terjedéssel nem kell számolni.

A házisertés ciklus (domesticus ciklus) során a házisertések közötti érintkezéssel terjed a vírus, a kullancsok, mint természetes rezervoárok jelenléte nélkül, esetenként vaddisznó közreműködéssel. A terjedés közvetlen érintkezéssel, de indirekt módon ragályfogó tárgyakkal, sertés termékekkel is bekövetkezhet. A ciklus fenntartásában és a vírus nagy távolságokra történő eljuttatásában anthropogén tényezők döntő szerepet játszanak.

2014-től Kelet-Európában egy az eddigiektől eltérő, az európai vaddisznó élőhelyekhez köthető ciklust is megfigyeltek (34). A vaddisznó élőhely ciklusra jellemző, hogy a vírus függetlenül a házisertésektől és a kullancsoktól a vaddisznó állományban fennmarad. A vaddisznók között a terjedés közvetlen érintkezéssel, vagy indirekt módon történhet (szennyezett élőhely, fajtársak maradványainak eltakarítása). Az élőhelyen talált hullákkal történő érintkezés (dögevés/kannibalizmus) fontosabb járványterjesztő, mint az élő állatok közötti közvetlen érintkezés. A vér és a szervek is magas titerben tartalmazzák a vírust, ezért különösen fontos a hullák mihamarabbi eltávolítása. A vaddisznók fertőzik a környezetüket, ahonnan a kis és nagy létszámú sertés állományokra is áterjedhet a vírus (82). Egyértelmű összefüggést mutattak ki a fertőzés előfordulása és a vaddisznó létszám, illetve az állomány sűrűség között. 0,5 állat/km² állomány sűrűség alatt a járvány nem terjed. A hideg, nedves időjárás jelentősen megnöveli a vírus túlélését, fagyasztva akár évekig fertőzőképes. A hullában (fagyponthoz közeli hőmérsékleten, télen) konzerválódhat a vírus (áttelem). Ahol a vaddisznó a vírus rezervoárja ott csaknem az összes házisertés eset kapcsolatba hozható a vaddisznóval.

A fertőzési ciklusok egymástól függetlenek, a ciklusok közti átvitel lehetséges, csak a házisertés ciklusban szerepelnek anthropogén tényezők. A jelenleg zajló járvány során Kelet-és Nyugat-Európában a vaddisznó valódi rezervoár, míg Dél-Kelet Európában (Románia, Bulgária, Horvátország) a kistermelői sertések a vírus fő rezervoárjai, azonban a két fő járványtani ciklus gyakran összekapcsolódik.

A járvány „normál esetben” a vaddisznók között viszonylag lassan terjed (1-2 km/hó, 30-60 km/év) (30). Házisertések között, illetve vaddisznóról házisertésre emberi közreműködéssel,

járványvédelmi szabályok megszegésével terjed (anthropogén terjedés), ha a vaddisznókban megjelenik rövid időn belül bekerül a házisertés állományba is (Balti államok, Lengyelország, Románia, Szlovákia, Németország) (52, 82). A vírus nagy távolságokat csak emberi közvetítéssel tud megtenni (illegális tevékenységek): Belgium, Csehország, Csendes-óceáni szigetvilág, Kelet-Timor, Indonézia, Pápua Új-Guinea, Honduras, Olaszország, Svédország.

A leggyakoribb oronasalis fertőzést követően a vírusszaporodás a mandulákban és a garat nyálkahártyán kezdődik, majd a nyirokkeringéssel a vírus az áll alatti-, garat mögötti nyirokcsomóba jut. 15-20 órával a fertőzés után a vérkeringéssel eljut a csontvelőbe, lépbe, májba, nyirokcsomókba és a tüdőbe. Az általános vírusszaporodás 30-72 órával a fertőzés után megindul, a szövetekben a maximális vírustiter 72 óra múlva alakul ki (42).

Szerológia, immunitás

Az I genotípussal endémiásan fertőzött kelet-afrikai területeken megfigyelték, hogy a keletkezett ellenanyagok vírussemlegesítő hatása nem megfelelő, de a keletkezett ellenanyagoknak szerepük van a betegség kórfejlődésében. A természetes vagy mesterséges fertőzést túlélő sertések ellenállnak a virulens vírussal történt homológ ráfertőzéssel szemben, de a törzsek közti keresztvédelem gyenge. A fertőzést követő 7-10 nap múlva ellenanyagok jelennek meg, melyek 2-3 évig (élethossziglan) kimutathatók, a kocák a főcstejjel ellenanyagot adnak át a malacoknak (98), ezek az ellenanyagok 3 hónapig perzisztálnak. A vírus és a specifikus ellenanyagok egyidejűleg is jelen lehetnek a véráramban. Az intenzív vakcina fejlesztési kísérletek ellenére hatékony és biztonságos kereskedelmi vakcina jelenleg még nem áll rendelkezésre (8, 112).

Vírushordozás

A betegség minden életkorban közel 100 %-os mortalitással jár, azonban egy fertőzött állományban néhány állat mégis túlélheti akár a heveny, a félheveny és az idült formát is és meggyógyulhat. A túlélő, már klinikai tüneteket nem mutató állatok folyamatosan fertőzöttek maradhatnak, az ilyen állatok fertőzésterjesztő szerepének irodalmi megítélése ellentmondásos (64). Közepes virulenciájú vírussal (DR'79) végzett kísérleti fertőzés során a nyirokcsomókból és a tonzillákból 12 hétig lehetett a vírust kimutatni (62). Az átvészelt sertések kísérleti körülmények között a közepes virulenciájú vírust (Málta/78) közvetlen érintkezéssel 30 napig terjesztették, ha vérrel is érintkeztek (pl. verekedés), akkor akár 56 napig. A nyirokcsomóból a fertőzést követő 6

hónap múlva is izolálható volt a vírus (Wilkinson, 1984), a DNS PCR-rel a perifériás vér mononukleáris sejtjeiből 500 nap után is kimutatható, bár a vírust ekkor már nem tudták izolálni (20). A fertőzésen átesett sertések 30-40 napnál tovább általában nem ürítik a vírust. I genotípusú vírussal (Netherlands'86) végzett vizsgálatokban a vírust a szervekből, szövetekből a 60. nap után nem lehetett izolálni, de a vírus DNS a perifériás vér mononukleáris sejtjeiből 91 napig kimutatható volt (90). ASPV II genotípusú vírussal fertőzött (POL/2015/Podlaskie/Lindholm) viraemiás állatok istállója csak 1 napig volt fertőző, a 3.-5.-7. nap után bekerült állatokban nem jelentek meg tünetek, a vírus nukleinsav sem volt kimutatható (84). Kelet-európai ASP járvány során tett megfigyelések szerint a túlélők látszólag nem terjesztik a vírust, még nem mutattak ki krónikusan fertőzött állatot.

ASPV II genotípus a vérben $10^{6,4}$ - $10^{8,6}$, a bélsárban $10^{1,0}$ - $10^{2,0}$, az orrváladékban $10^{1,0}$ - $10^{4,0}$, a szervekben $10^{6,0}$ titerben van jelen (22, 53).

Az afrikai sertéspestis klinikai tünetei, kórbonctani elváltozásai

A betegség klinikai tünetei és a kórbonctani elváltozások a vírustörzsek virulenciájától, a fertőződés módjától, a fertőző vírus mennyiségétől, az állatok fajától, immunállapotától függően különbözőek lehetnek. A magas virulenciájú törzsek a betegség túlheveny és heveny, a közepes virulenciájú törzsek a betegség heveny és félheveny, míg az alacsony virulenciájú törzsek a betegség idült formáját idézik elő (38, 61).

A magas virulenciájú törzsek okozta **túlheveny forma** esetén 41-42 °C láz, étvágytalanság, bágyadtság, szapora légzés és a bőr kipirulása tapasztalható. Az állatok az első klinikai tünetek megjelenését követő 1-4 napon belül hirtelen elhullanak.

A betegség leggyakrabban a magas vagy közepes virulenciájú törzsek okozta **heveny formában** jelentkezik. Az állatok összebújnak, étvágytalanok, bágyadnak, 40-42 °C a testhőmérsékletük, nehezített légzés és tüdő ödéma jelei figyelhetők meg (88, 96). A megbetegedett állatok 1 hetes lázas időszak után shock tünetei között elhullanak, ilyenkor habos tartalom jelenhet meg a szájnyílások és az orrnyílások környékén. A fülek hegyén, a farok környékén, a végtagokon, a mellkas oldalán, a hason és a perianalis tájékon a bőr kipirul, cianotikussá válik, apró bőrelhalások és bőr alatti vérzések láthatók. Ritkán észlelhető nyálkás orrfolyás, orrvérzés, hányás, hasi fájdalom, bélsárpangás, hasmenés (amely kezdetben nyálkás, később véres). Ritka a vemhes kocák vetélése. A betegség heveny formájában szenvedő állatok 90-100 %-a az első tüneteket követő 1 héten belül elhullik. A bőrpír és a cianózis megjelenésével egyidőben elhullott állatokban kialakul a betegségre nagyon jellegzetes hyperaemiás lépduzzanat,

ilyenkor a lép akár hatszorosára is megnagyobbodhat, a szélei lekerekednek, állománya törékennyé, feketevörös színűvé válik, kitöltheti szinte az egész hasüreget. A gastrohepaticus és a vese környéki nyirokcsomók velőállományában vérzések jelennek meg, ami miatt a nyirokcsomók márványozottnak tűnnek. A vesék kéregállományban és a vesemedencében pontszerű vérzések lehetnek. Vérzések keletkezhetnek a húgyhólyag nyálkahártyájában, a szívburok külső és belső hártája alatt, valamint a mellhártyán is (40, 61, 96).

A közepes virulenciájú vírusok okozzák a betegség **félheveny formáját**, mely során a heveny formához hasonló, de enyhébb tüneteket és elváltozásokat látunk, azonban az érelváltozások következményei a vérzések és az ödémák kifejezettebbek (51). A vetélés gyakran a félheveny forma első tünete, a megbetegedett sertések a 7-20. napon elhullanak, a mortalitás 30-70 %, a túlélők 3-4 hét alatt meggyógyulnak, azonban akár 6 hétig is üríthetik a vírust (61). Az állatok mérsékelten lázasak, hasvízkór, szívburokvízkór és a jellegzetesnek tekinthető epehólyagfal ödémás beszűrődése látható, hatalmas ödémák alakulhatnak ki a vesék környékén is. A lép mérsékelten, részlegesen hyperaemiás, a nyirokcsomók vérzések, ödémásak, törékenyek, gyakran feketevörös hematómának tűnnek (50). A vesevérzések kifejezettebbek lehetnek, mint a heveny forma esetén.

Az alacsony virulenciájú törzsek a betegség jellegtelen tünetekkel járó **krónikus formáját** okozzák. Ilyen, a bőr elhalásos elváltozásával és ízületgyulladással, növekedésbeli elmaradással, sántítással, enyhe légzőszervi tünetekkel járó kórképeket figyeltek meg Spanyolországban, Portugáliában és a Dominikai Köztársaságban. Az idült formára jellemző az érelváltozások hiánya és a másodlagos baktériumos fertőzések megjelenése (fibrines mellhártyagyulladás, fibrines pericarditis, elhalásos tüdőgyulladás, fibrines ízületgyulladás, bőrelhalások, elhalások a tonzillákban és a nyelven) (59). Az alacsony virulenciájú, nem hemadszorbeáló törzsek **szubklinikai fertőzést** okoznak, aminek gyakran az egyetlen jele a szerológiai áthangolódás.

II genotípusú ASPV okozta járvány során megfigyelt klinikai tünetek, kórbonctani elváltozások

Az ASPV II genotípus nagyon virulens, az általa okozott megbetegedés heveny formája közel 100 % mortalitással jár vaddisznóban és házisertésben is kortól, nemtől, fertőzési módtól függetlenül. A lappangási idő 3-5 nap, a fertőzést követő 7-13. napon, az ellenanyag termelődés kezdete előtt az állatok elhullanak. Kivételesen hosszabb lefolyású a megbetegedés, elhullás 21 napon belül, vagy akár gyógyulás is lehetséges (krónikus formát kivételesen észlelnek, tartósan vírusshordozó egyedről eddig nem számoltak be). A vírussal fertőzött sertésfélékben megfigyelt

lappangási időket és a fertőzőképes vírus maximális kimutathatósági idejét az European Food Safety Authority (EFSA) foglalta össze (29).

A 2007-2020 közötti II genotípusú ASPV okozta járvány során a lappangási idő 3-4 nap volt, vírusürítést 2-9 nap között figyeltek meg, az állatok a fertőződést követő 7-9 napon belül elhullottak (16, 43).

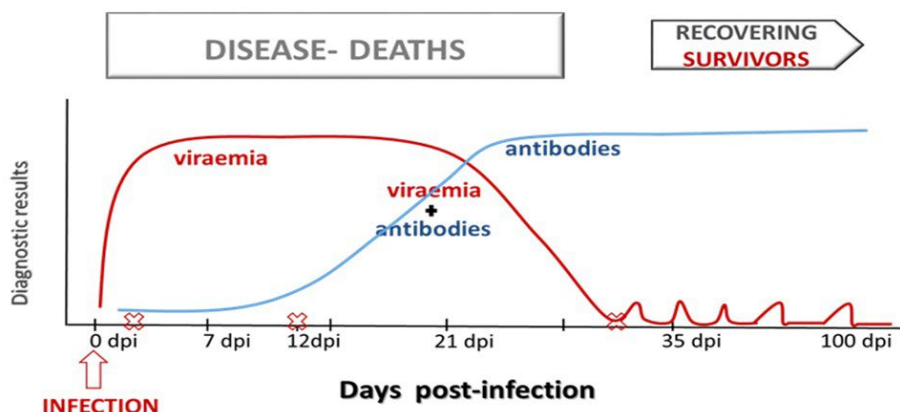
A vaddisznóban megfigyelt klinikai tünetek nem jellegzetesek, megváltozik a viselkedés, az állat könnyen „baleset” áldozatává válik. Ritkán vehető észre étvágytalanság, bágyadság, inkordinált mozgás, támolygás, nehezített légzés, bőrpír, a fül hegyének cianózisa, esetleg pontszerű vérzések a végtagokon. A moribund állatok a láz miatt a vizes, hűvös, nedves élőhelyeket keresik, ezért az állati tetemeiket gyakran a vízfolyások környékén találják. Boncolással tüdőödéma, savós-véres hasúri szabad tartalom, testszerte vérzések, többszörösére megnagyobbodott lép (a betegségre kórjelző), a metszészlapra elődomborodó vörös lép pulpa, ödémás, duzzadt, vérzéses nyirokcsomók, vesevérzések észlelhetők. A gastrohepaticus és a vese környéki nyirokcsomók a legsúlyosabban érintettek, az epehólyagfal ödémás beszűrődése is látható (21, 23, 68).

A fertőzött állatok 75-90 %-a 7-14 napon belül elhullik, ellenanyag pozitivitás ritka, az elhullás az ellenanyagválasz kialakulása előtt bekövetkezik. Az elhullva talált állatok 70-95 %-a vírus pozitív, a vadászat során lőtt állatok 0,5-3 %-a vírus pozitív, a vadászat során lőtt állatok 0,0-2 %-a ellenanyag pozitív.

Elkülönítő kórjelzés

A betegség kórhatározása során különösen a kezdeti esetekben, kis számú állat megbetegedése és elhullása esetén, a kevésbé jellegzetes tünetek/eltérések megítélése nagy körültekintést igényel. A vaddisznókban, házisertésekben kialakuló kórképet el kell különíteni a klasszikus sertéspestistől, a circovírusos fertőzésektől (PCAD), a nagy pathogenitású PRRS-től, a sertésorbáncától, a szalmonellózistól, a pasteurellozistól, a streptococcozistól, az eperythrozoonozistól, az actinobacillozistól, a Glasser betegségtől (*Glaesserella parasuis* fertőzéstől), az Aujeszky betegségtől, a leptospirózistól, az ödémabetegségtől, a sertésdysenteriától, a thrombocytopeniás vérzésektől, warfarin mérgezésről, nehézfém mérgezésektől, más septicaemiás vagy vérzéses kórképektől. A fentiek miatt a laboratóriumi vizsgálatok nélkülözhetetlenek az afrikai sertéspestis megállapításához és a hozzá hasonló megbetegedések kizárásához.

Az afrikai sertéspestis vírus fertőzés dinamikája és a betegség lezajlása



Clinical forms of African swine fever according to the virulence of the isolate involved



1. Ábra: A fertőzést követő 1-2 nap múlva kezdődik a viraemia és tart 3-4 hétig. Az ellenanyagok a 9.-14. napon jelennek meg és akár évekig is perzisztálhatnak. A kép forrása: <https://asf-referencelab.info/asf/en/procedures-diagnosis/diagnostic-procedures>

Laboratóriumi vizsgálatok

Az afrikai sertéspestist nem lehet klinikai és/vagy kórbonctani vizsgálattal egyértelműen megállapítani, ezért a laboratóriumi vizsgálatok nélkülözhetetlenek a pontos kórjelzés és a sikeres leküzdési intézkedések meghozatala érdekében. A betegség kórokozójának kimutatására direkt, a keletkezett ellenanyagok kimutatására indirekt módszerek állnak rendelkezésünkre (44). Ideális esetben a betegség kórjelzésére mind a kórokozó kimutatási módszerek, mind az ellenanyag kimutató eljárások alkalmazhatók, azonban a (molekuláris) vizsgálatok magas költségei, a vírusizoláláshoz szükséges feltételek hiánya, a mintavétel nehézségei, a különböző járványtani helyzetek és az ezek kezeléséhez szükséges specificitás és szenzitivitás módosíthatják az igénybevett eljárásokat. A betegség leküzdése szempontjából a fertőzést követő néhány nap múlva, (még a klinikai tünetek megjelenése előtt) a viraemia kezdetén a vírus kimutatásának, míg a fertőzés későbbi szakaszában (krónikus, vagy szubklinikai fertőzések) az ellenanyagok kimutatásának van nagyobb jelentősége (1. ábra). A vírus pozitívitas ellenanyag negativitással a jelenlegi, friss (7-14 napon belüli) fertőződést, a vírus pozitívitas és az ellenanyag pozitívitas a folyamatban lévő fertőződést (7-14 napon túli), míg az ellenanyag

pozitivitás vírus negativitás a múltbeli fertőződést (az állat túlélte a fertőzést, attenuált törzssel fertőződött) jelenti (37).

Mintavétel, mintaküldés, kísérőirat, csomagolás

Megbízható laboratóriumi vizsgálatokat csak a vizsgálatok céljának megfelelő (betegség megállapítás, betegség kizárás, járványtani nyomonzés, mentesség igazolás) mintavétellel lehet elérni. Az afrikai sertéspestis megállapítása/kizárása érdekében az Európai Unió Afrikai Sertéspestis Referencia Laboratóriuma (<https://asf-referencelab.info/asf/en/>) és a WOAHA Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2021 Chapter 3.9.1 African Swine Fever által ajánlott mintákat kell megvizsgálni (109). Korábban az afrikai sertéspestis diagnosztikai kézikönyvének jóváhagyásáról szóló 2003/422/EK Bizottsági határozat melléklete (ASPV diagnosztikai kézikönyv) szabályozta a vizsgálatba bevonandó minták körét (3).

A betegség gyanúja esetén az elhullott, vagy diagnosztikai célból leölt sertésekből (vaddisznókból) mandula, áll alatti, garat mögötti, fültő alatti, bélfodri nyirokcsomó, lép, vese, tüdő, csípőbél, csöves csont, szegycsont, natív vérminta és alvadégtartó vérminta (EDTA) laboratóriumi vizsgálata szükséges. Az elhullott állatokból származó szivacsos csontállományt tartalmazó egész csöves csont (combsont, karcsont, esetleg szegycsont) minták még hónapokkal az állat elhullása után is sikerrel vizsgálhatók. A szervekből egyedenként, kb. kockacukornyi darabot kell venni és a laboratóriumba küldeni. Vadászat során kilőtt egészséges vaddisznóból a szívből, vagy a nagy erekből vett véralvadék és mandula minta is elegendő. Laboratóriumunkban a csontvégeket a csak erre a célra használt (minden használat után dekontaminált) barkácsfúróval megfúrjuk és a keletkezett csontforgácsot tesszük egy acél golyót tartalmazó eppendorf csőbe, melyet a továbbiakban már a szervekkel azonos módon vizsgálunk.

A mintákat a kórjelzéshez és az esetleges további intézkedésekhez szükséges információkat tartalmazó kísérőirattal együtt kell laboratóriumba juttatni. A kísérőíraton fel kell tüntetni az állatok tartási helyét, tulajdonosát, a tapasztalt főbb klinikai tüneteket, kórbonctani elváltozásokat, vaddisznók esetén a kilövés és/vagy a hulla feltalálásának helyét és idejét, a nagyvadazonosító számot, a vadgazdálkodási egység megnevezését, a kilövő/megtaláló vadász nevét, a kilövési hely pontos földrajzi koordinátáit, valamint az állati test rendeltetési helyét és az esetleges felhasználás célját. Magyarországon minden kilőtt, vagy elhullott vaddisznó a kilövéskor, vagy a tetem megtalálásakor egy hatjegyű azonosítószámot egy un. nagyvadazonosító számot kap (12, 78). A laboratóriumi vizsgálat során többek között ezzel a számmal azonosítjuk a mintát.

A vaddisznókból történő szakszerű mintavétel elősegítésére egységcsomag áll rendelkezésre, melyet a hatóság térítésmentesen biztosít. A mintákat a NÉBIH ÁDI telephelyeire kell juttatni. A NÉBIH rendszeres mintabegyűjtő körjáratokat szervez, melyekkel a minták közvetlenül a vizsgáló laboratóriumokba juttathatók. A tépőzáras, öntapadós tasakkal felragasztott, kísérőiratot mellékelten tartalmazó tasak, a benne lévő műanyag vérvételi csővel és a kb. 50-100 ml mintagyűjtő tégellyel, feltűnő piros színével már kívülről felhívja a figyelmet az ASP-re. Kerülni kell a kísérőirat és a mintatartó tégelyek közvetlen érintkezését és ügyelni kell arra, hogy a minta azonosításához szükséges legfontosabb adatok már kívülről is láthatóak legyenek. Fontos a minták megfelelő azonosíthatósága, a zárható, szivárgásmentes csomagolás, a lehető leghamarabbi (gyanú esetén azonnali, egyéb esetekben 48 órán belüli) hűtött szállítás. A minták fagyasztását kerülni kell. ASP gyanú esetén a vizsgáló laboratóriumot értesíteni kell az ilyen minta indításáról. A minták csomagolásán fel kell tüntetni az átvevő laboratórium címét, továbbá azt, hogy „Állati kórtani anyag; Romlandó; Törekeny; Az ASP laboratóriumon kívül ne nyissa ki.” (12, 86).

Alternatív mintavételi lehetőségek

Az ASP elleni védekezés során kiemelten fontos a környezet (a mintavételi hely) vírusterhelésének csökkentése és a mintavétel egyszerűsítése. Házisertések esetében a teljes boncolás helyett javasolják a jobb oldalára fektetett sertés bal bordaíve mentén ejtett vágással a lép, illetve egy részének kiemelését. Mások szerint vaddisznók esetében a lövési csatornából tamponnal történő mintavétel is alkalmas mind a vírus, mind az esetleges ellenanyagok kimutatására (60). A felületes lágyéki nyirokcsomók vizsgálatát is érzékeny módszernek találták (63). A Whatmann 903 szűrőpapíron beszárított vérminták „dried blood spot sampling”, vagy FTA kártyák (Flinders Technology Associates) és beszárított tamponminták a specificitásuk és érzékenységük révén alkalmasak lehetnek az ellenanyag és/vagy a vírus nukleinsav kimutatására. Legfőbb előnyük, hogy a minta levegőn történő kiszáritása után nem igényelnek hűtést, alapvetően nem túl költségesek, a mintavétel sem igényel nagy szakértelmet (vadászok által is kivitelezhető) és hosszabb ideig akár 2 hónapig is eltarthatók (17, 19, 60, 66, 91, 94).

Az egyes minták értékelése

Alvadásgátolt vérminta (teljes vér), savó (natív vérminta)

Egyedenként minimum 2-5 ml vérmintát kell venni az elülső üresvénából, az alvadást EDTA-val (etilén-diamin-tetra-ecetsav) kell meggátolni. Más alvadásgátlók (heparin) használata

nem javasolt, mert gátolják a PCR reakciót (fals negatív eredmény), vagy fals pozitivitást okoznak a HAD tesztben. Az alvadásgátlót nem tartalmazó vérmintát 8-10 óráig szobahőmérsékleten kell tartani, hogy a savó elkülönüljön, majd centrifugálás követően a savó leönthető. A jó minőségű savó világos, tiszta, áttetsző, nem opaleszkál, alakos elemeket nem tartalmaz. A vörösen elszíneződött savó hemolízisre utal, súlyosabb fokú hemolízis már gátolja az ELISA reakciót. Különös körtekintéssel kell kezelni a lőtt vaddisznókból gyűjtött vérmintákat.

Véralvadék

Vaddisznók esetében a közvetlenül a lelövés, vagy az állati test feltalálása után a szívből, vagy a nagy vénákból kell véralvadékot venni. A véralvadék a különböző szervekhez hasonlóan PCR vizsgálatokhoz, a belőle kiszoruló savó az ELISA (szerológiai) vizsgálatokhoz használható.

Szervek

Az Országos Főállatorvos korábban már említett határozata részletezi, hogy az elhullott, vagy diagnosztikai célból leölt sertésekből (vaddisznókból) mandula, áll alatti, garat mögötti, fültő alatti, bélfodri nyirokcsomó, lép, vese, tüdő, csípőbél, csöves csont, szegycsont minták vizsgálata szükséges. Ezek közül a legfontosabb a lép, a nyirokcsomók és a mandulák, mert igen nagy mennyiségben tartalmazzák a vírust és a lép kivételével az autolízisnek is viszonylag ellenállnak. Idősebb már autolizált hullák esetén a csontvelő vizsgálata -gyakran már csak egyedüli lehetőségként- nélkülözhetetlen. Az ízületek, illetve az ízületi folyadék a csökkent virulenciájú vírusok vizsgálata során lehet hasznos.

Bélsár, oral fluid (nyál), húslé (meat juice) minták vizsgálata fontos adatokat szolgáltat a betegség kórfejlődéséről, a vírus elterjedtségéről, de az ASP elleni védekezés jelenlegi európai szakaszában a fertőződés megállapítására, vagy a mentesség igazolására nem használhatók.

Élelmiszerek

Az afrikai sertéspestisnek nincs közegészségügyi vonatkozása, ezért az élelmiszerminták vizsgálatának elsősorban tudományos jelentősége van. Az állati eredetű (sertés, vaddisznó) élelmiszerek vizsgálata a kórokozó túlélésével és a járványtani nyomozással kapcsolatosan szolgáltat nélkülözhetetlen adatokat. A betegség felismerése szinte kizárólag az állatok megbetegedése, elhullása, vagy az állatok diagnosztikai leölése után és nem az élelmiszerminták vizsgálatán alapul. A határőrizeti ellenőrzések során a turistaforgalomban illegálisan behozott, fertőzött területekről származó sertéstermékeket indokolt lehet ASP vizsgálatnak alávetni. Az eredmények értékelése során figyelembe kell venni, hogy a különböző technikákkal kimutatott

vírus(nukleinsav) aktív járványterjesztő, vagy (hőkezelt termékekben előforduló, inaktivált vírusként) csak a származási hely fertőzöttségét jelzi (105).

A vírus kimutatás módszerei

A betegséget okozó Asfvírus sertés csontvelősejtekből, sertés fehérvérsejtekből készített sejttenyészetben, vagy különböző sejtvonalakban izolálható. A vírus a megbetegedett állat szerveiből (mandula, lép) immunfluoreszcenciás módszerrel, a vírus antigénjei antigénkimutató ELISA-val, gyors tesztekkel, (pen-side teszt, lateral flow devices) (*Eurofins INgezim ASFV CROM Ag rapid antigen test, Bionote Anigen ASFV Ag Rapid Test, PenCheck Rapid Screening Test for ASFV, Shenzhen Lvshiyuan Biotechnology Co. ASF Antigen Detection rapid test*) (97), a vírus nukleinsav valós idejű polimeráz láncreakcióval (real-time PCR) és gél alapú PCR reakcióval is kimutatható (47). A hemadszorpcióval, vagy immunfluoreszcens festéssel kiegészített vírusizolálás érzékeny megerősítő módszer a fertőzőképes vírus kimutatására, azonban nagyszámú rutinvizsgálatra alkalmatlan. Az antigénkimutató ELISA (*Eurofins INgezim PPA DAS 2.0 double antibody ELISA*) segítségével alvadásban gátolt vérből, sejttenyészet felülúszójából, vagy sertés lépből két monoklonális ellenanyag segítségével lehet a vírust kimutatni. A néhány csepp (kb. 20 µl) friss, vagy hűtött, alvadásban gátolt vérből, 15-30 perc alatt elvégezhető antigén kimutató gyors tesztek a gyakorlatban akkor igen értékesek, ha a laboratórium és a képzett személyzet nem vagy nehezen érhető el. Ezek a gyors tesztek specifikusak, de az érzékenységük (szenzitivitás) a minták rossz minősége, autolizáltsága és a félheveny vagy idült esetekben a megjelenő ellenanyagok miatt alacsony. Az ilyen gyors tesztek hasznosak a klinikai, kórbonctani vizsgálat kiegészítésére, de a betegség hivatalos megállapítására vagy a mentesség igazolására nem használhatók.

A mindennapi laboratóriumi diagnosztikában a nagyfokú érzékenység és specificitás, az automatizálhatóság és a tömeges vizsgálati lehetőség miatt a valós idejű (real-time) PCR terjedt el. A betegség adott területen való első megállapításhoz az NRL megerősítő vizsgálata szükséges.

Az ASPV vírusának kimutatása real-time PCR módszerrel

Az utóbbi néhány évben az ASPV genom kimutatására alkalmas PCR tesztek száma rohamosan megnövekedett. (*Pl. Virella ASFV seqc real-time PCR kit (Gerbion, Kornwestheim, Germany), VetMax™ ASFV Detection kit (Thermo Fisher Scientific, Lissieu, France), ViroReal® Kit ASF Virus (Ingenetix, Vienna, Austria), Kylt ASF (AniCon Labor GmbH, Höltinghausen, Germany), Virotype ASFV PCR kit (Indical, Leipzig, Germany), Virotype ASFV 2.0 PCR kit*



**PARTNERSHIP
WITHOUT BORDERS**



(Indical, Leipzig, Germany), ID Gene™ African Swine Fever Duplex (Innovative Diagnostics, Grabels, France), Real PCR ASFV DNA Test (IDEXX, Hoofddorp, Netherlands), VetAlert ASF PCR Test Kit (Tetracore, Rockville, USA), INgene q PPA (Ingenasa, Madrid, Spain), Adiavet ASFV Fast Time (Bio-X Diagnostics, Rochefort, Belgium), GeneReach POCKIT African Swine Fever Virus iiPCR, GeneWorks LAMP African Swine Fever Virus test kit (GeneReach, Taichung, Taiwan), ID Gene™ African Swine Fever Triplex (Innovative Diagnostics, Grabels, France)) (5, 39, 73, 92, 102). Kidolgoztak az ASP és a klasszikus sertéspestis egyidejű kimutatására alkalmas multiplex PCR eljárásokat is, melyeknek akkor van jelentősége, ha endémiás területeken mindkét vírus cirkulációjára, vagy mentes területeken a vírusok behurcolására kell számítani (6, 54).

A PCR vizsgálat néhány óra (maximum egy munkanap) alatt elvégezhető, ezáltal a járványvédelmi intézkedések késlekedés nélkül meghozhatók. Nem szükséges a vírus szaporítása, azonban különálló helyiségeket, speciális műszerekkel felszerelt laboratóriumot és szakképzett személyzetet igényel. PCR-rel mind a 24 genotípusba tartozó törzs kimutatható, függetlenül a virulenciától, vagy a hemadszorpciós képességtől. PCR-rel a vírus egy nagyon konzervált szakaszát a VP72 fehérjét kódoló gén egy részét kíséreljük meg kimutatni (25, 39). A hagyományos PCR több időt, munkát és ráfordítást igényel. A PCR még akkor is pozitív lehet, ha vírusizolálással már nem mutatható ki fertőző vírus (pl. autolizált szövetek, lebomló állati szövetek, vagy rekonvalescens sertésekből vett minták). A vizsgálatok költségei csökkenthetők a minták bizonyos mértékű elegyítésével (poolozásával), anélkül, hogy a reakció érzékenysége számottevően csökkenne.

A PCR nagyfokú érzékenysége miatt különös figyelmet kell fordítani a téves pozitív reakciókra (kontamináció) és a rossz minőségű minta miatti (már lebomlott nukleinsav, gátló anyagok jelenléte) téves negatív eredményekre is (99). A téves pozitívítás származhat az ASP vírust tartalmazó mintából, a nukleinsav kivonási kontrollból, vagy a pozitív kontrollból kereszt-kontamináció (a nukleinsav továbbvitele mintáról/kontrollról másik mintára: endogén szennyeződés), a laboratóriumban szennyeződött reagensektől, eszközöktől (exogén szennyeződés). A téves pozitívítás elkerülése érdekében a PCR során a vizsgálat különböző szakaszait egymástól jól elkülöníthető (minta előkészítés, nukleinsav kivonás, primerek-probok-mastermix kimérése, reakció összeállítása, géldokumentáció-agaróz gél elemzés) helyiségekben kell végezni, a munkafolyamatokat egy irányba a DNS-sel való terheltség növekedésének megfelelően (tisztá→piszkos) kell szervezni. A dolgozóknak egyszerűhasználatos kesztyűt kell viselni és a kesztyűt gyakran kell cserélni, a pipettázáshoz egyszerűhasználatos steril szűrős (aerosol resistant) pipettahegyeket és a vizsgálatok során is általában steril egyszerűhasználatos eszközöket

kel használni. A master mix összeállítására szolgáló helyiségben tiszta (más munkafolyamat során nem használt) védőruházatot kell használni. A PCR terméket tartalmazó csöveket csak az erre a célra szolgáló helyiségben szabad kinyitni. A több részletben felhasználandó reagenseket aliquotolni kell, a méréseket biztonsági fülkében, vagy PCR munkaállomásban kell végezni. Az ajtókat folyamatosan zárva kell tartani, kerülni kell a fokozott légmozgást. Az eszközöket, berendezéseket, felületeket folyamatosan fertőtleníteni, dekontaminálni kell. Az NTC használata (Non Template Control; valamennyi reagenst tartalmaz, de a minta nukleinsav helyett vizet mérünk) segíti a reagensek, vagy a minták kontaminációjának a felismerését. Téves pozitív eredményre vezethetnek a gyakorlatban (helyszínen) történő, esetenként tömeges mintavétel során elkövetett mintavételi hibák. Téves eredményeket (de nem téves PCR reakciót!) okozhatnak a mintavétel során a mintavevő ruházatának, kesztyűjének szennyeződése, a használt eszközök (kés, olló, szike) dekontaminációjának elmaradása, a helytelen mintavételi technika.

Laboratóriumunkban az afrikai sertéspestis vírusának kimutatására real-time PCR módszerrel a Virotype RT-PCR Kit 2.0 Kit-et használjuk. A vizsgálatokhoz sertés (vaddisznó) szerveket és alvadásban gátolt vérmintákat dolgozunk fel a Handbook for detection of DNA from African swine fever virus (ASFV) kézikönyv szerint (25, 103).

A fertőzés kórjelzése szerológiai módszerekkel

A fertőzésen átesett állatokban a 6-8. napon ellenanyagok jelennek meg, melyek hosszú ideig, akár éveken keresztül is kimutathatók. Európában vakcina, illetve vakcinázás hiányában a szeropozitivitás egyértelmű áthangolódást jelent. A szerológiai próbák nem tudják megkülönböztetni a maternális és a fertőződés következtében keletkezett ellenanyagokat. Az ellenanyagok ELISA-val, immunoblott technikával (IBt), indirekt fluoreszcens ellenanyag vizsgálattal (IFAT), indirekt immunoperoxidase teszttel (IPT) és ellenanyag gyorsesztekkel (LFT) mutathatók ki (47). Főleg a fertőzés kezdeti szakaszában (7-12 nap) az ELISA tesztek szenzitivitása alacsony, azonban a fertőzés későbbi szakaszában nagyon jól használhatók. A virulens, II genotípusú vírus okozta fertőzés heveny megbetegedés, ezért a jelenlegi járvány során az állatok az ellenanyagok megjelenése előtt általában elhullanak. A kísérletek szerint a 16/21. napon a biztosan fertőzött és még élő állatoknak csak 10 %-a (3/30) szeropozitív. Endémiás területeken, alacsony virulenciájú vírus okozta fertőzések esetén a tünetmentes fertőződés kimutatására a szerológiai eljárások nélkülözhetetlenek. A gyakorlatban az egyszerűség, a gyorsaság és az automatizálhatóság miatt leginkább az ELISA eljárások terjedtek el (*Eurofins Ingenasa INgezim ASF ASFV-R indirect ELISA (cp312 and p30)*, *Eurofins Ingenasa INgezim PPA*



**PARTNERSHIP
WITHOUT BORDERS**



COMPAC blocking ELISA (P72), Svanova Svanovir ASFV-Ab Indirect ELISA (p30), ID Screen® African Swine Fever Indirect - Screening test, ID Screen® African Swine Fever Indirect - Confirmation test). Az immunkromatográfiás elven működő gyors tesztek (*Eurofins INgezim ASFV CROM Ab rapid antibody test (p72), Eurofins INgezim ASFV/CSFV CROM Ab rapid antibody test (p72), Global Dx GDX70-2 Herdscreen® ASF Antibody rapid tests*) a laboratóriumban elvégezhető ELISA tesztekhez hasonló érzékenységek és specificitásúak, 10-20 µl friss, hűtött vagy fagyasztott savóból és alvadásgátolt vérmintából 10-30 perc alatt mutatják ki az ellenanyagokat. Léteznek az ASP/KSP ellenanyagok egyidejű kimutatására alkalmas gyors tesztek is. A várhatóan negatív minták ELISA vizsgálata során a negatív eredmények elfogadhatók, azonban a pozitív eredményeket a megerősítő szerológiai eljárásokkal immunoblott technikával (IBt), indirekt fluoreszcens ellenanyag vizsgálattal (IFAT), indirekt immunoperoxidase teszttel (IPT) meg kell erősíteni. Laboratóriumunkban az Ingezim PPA Compac K3 ELISA tesztet (Ingenasa) és/vagy az ID Screen® African Swine Fever Indirect Confirmation tesztet használjuk (57, 58).

Vizsgálati eredmények közzéte

A reakciók végrehajtása után az eredményeket a szakmai nyilvántartó rendszerünkben (LABOR rendszer) rögzítjük és azok a felvállaló laboratórium által kilevelezhetők, illetve a vármegyei kormányhivatalok számára azonnal hozzáférhetők. A hatóság munkatársai a részükre biztosított egyedi jelszóval az illetékességi területükre vonatkozó vizsgálatokról, azok állásáról információt szerezhetnek. A vizsgálatok eredményeit a jogszabályokban előírtak számára a LABOR rendszer által biztosított felületen és elektronikus levél formájában is elérhetővé tesszük.

Az afrikai sertéspestis vizsgálatával foglalkozó laboratóriumokra vonatkozó munkaszervezési és biológiai biztonsági szabályok (14, 65, 72)

Bejutás a laboratóriumokba

A bejáratok ajtóira ki kell helyezni a biológiai veszélyre figyelmeztető nemzetközi szimbólumot és feliratot. A laboratórium ajtajait csukva kell tartani. Gyerekek nem látogathatják a laboratóriumot. Csak engedéllyel rendelkezők mehetnek a laboratórium munkaterületére. Idegenek a laboratóriumokba csak a laboratóriumvezető engedélyével léphetnek be és ott csak kíséreléssel tartózkodhatnak.

A zárt laboratóriumba csak kivételesen (karbantartás) léphet idegen személy. A belépni szándékozót a belépés előtt a laboratórium területén való viselkedés szabályairól ki kell oktatni. A zárt laboratóriumba való belépés előtt ismertetni kell a belépő kötelezettségeit és a zárt laboratórium speciális előírásait: a belépés előtti teljes levetkőzés, speciális munkaruha és papucs viselése, a kezeket fertőtlenítő oldatban megmosni, távozás előtt le kell vetkőzni, a fürdőben háromszor szappannal és samponnal mosakodni kell. Fel kell hívni a figyelmét, hogy a laboratórium területére semmit nem vihet be, ha az eszközök bevitele mégis elkerülhetetlen, akkor azok csak a laboratóriumvezető által jóváhagyott fertőtlenítés után adhatók ki. Csak az a személy léphet be, aki a fentieket tudomásul veszi.

Fertőtlenítés

Debreceni Immunológiai, Virologiai és TSE Laboratóriumban alkalmazott fertőtlenítési eljárásokat az 5. melléklet tartalmazza.

Az ASP laboratórium működésére vonatkozó speciális szabályok

Az ASP laboratórium egy elkülönített laboratórium, ahol súlyos gazdasági kárral járó veszélyes állatbetegségeket okozó kórokozók jelenlétével kell számolni. A kórokozók kikerülési kockázatának minimalizálására a fentebb említett elvárások és előírások mellett speciális megszorítások és eszközök is szükségesek.

Laboratórium elrendezése és felszereltsége

A bejáratok ajtóinál a biológiai veszély nemzetközi jelét ki kell tenni. A laboratórium ablakai nem nyithatók, a rések, nyílások tömítettek, a szellőztetési rendszer negatív nyomású. A potenciális fertőző anyaggal végzett minden művelet lehetőség szerint biztonsági fülkében kell végezni. Csak név szerint meghatározott, kiképzett és engedéllyel rendelkezők mehetnek a zárt

laboratórium munkaterületére. A személyzet a laboratórium elhagyását követő 48 óraban nem kereshet fel sertéstartó helyeket.

A vizsgálati anyagokat egy kettős ajtón juttatjuk be, a két ajtó a szokásos működés során egyszerre nem nyitható, azonban vészhelyzet esetén az elektromos zár külön kapcsolóval nyitható. Vésznyitás esetén is mindent meg kell tenni a fertőzés/szennyezés kijutásának elkerülése érdekében. A laboratóriumba beosztott dolgozó vészhelyzet esetén a segélykérő (pánik) gomb közvetlen lenyomásával a portára tud hangjelzést adni. A jelzést észlelő feladata a segítségnyújtás beindítása, a közelben lévő munkatársak riasztása.

A zárt laboratóriumba történő belépés előtt a fertőzött övezetben használandó munkaruhát (fehérenemű, overál) elő kell készíteni. A laboratóriumba lépés előtt az előtérben teljesen át kell öltözni. A zárt laboratóriumrészbe semmilyen eszköz (pl. telefon) nem vihető be. A védőruha, papucs csak a zárt laboratóriumon belül használható. A használt védőruhát a laboratóriumból történő kilépéskor a zuhanyozás előtt le kell venni, ki kell dobni, a zuhanyzóban háromszor szappannal és samponnal mosakodni kell, zuhanyzás után elektromos hajszárítót, és higiénikus papírtörölközőt kell használni és a normál laboratóriumi ruházatba kell átöltözni.

A kórokozók megbízható inaktiválásához a mintát termoblokkban 72 °C 30 percig hőkezeljük (belső inaktiválás), majd az átadó ablakban 10 x hígított Virocid oldatban 15 percre alámerítve juttatjuk ki a laboratóriumból (külső fertőtlenítés).

A laboratóriumból újrafelhasználásra anyagokat, eszközöket nem szabad kiadni. A szennyezett/fertőzött hulladékokat az erre acélra gyártott, erős falú, kb. 60 literes műanyag zsákokba kell gyűjteni, úgy hogy a zsákok kívülről ne szennyeződjenek. Az esetleges szennyeződés esetén új zsákot kell használni. Szűrő-vágó eszközöket, éles, hegyes tárgyakat használat után azonnal szilárdfalú edénybe gyűjtjük és ezután tegyük a műanyag zsákba.

A hulladék laboratóriumból történő kijuttatása csak különleges elővigyázatosság mellett történhet, a kijuttatásról nyilvántartást kell vezetni, melyet a közreműködők aláírásával is el kell látni. Tiszta kesztyűvel a nem szennyezett zsákokat lezárjuk, tartójukból kivesszük, 10 x hígított Virocid oldattal lepermetezzük, majd a két ajtó közti kiadórésbe helyezük, vigyázva arra, hogy a zsákot a legkevesebb helyen érintsük és a zsák a kiadás közben a laboratóriumban ne szennyeződjön. A kiadóban ismételt permetezéssel újra fertőtlenítjük. Ezt követően a folyosó felől egyszerűhasználatos kesztyűvel a lehető legkevesebb érintéssel az előre odakészített badellába helyezük, a kesztyűt aszeptikus módon levesszük és szintén a badellába tesszük, majd a badellát lezárjuk és alapos permetezéssel kívülről ismételten lefertőtlenítjük. A badellán fel kell tüntetni a biológiai veszély nemzetközi jelét, a veszélyes anyag nevét.

A laboratóriumban keletkezett, illetve oda bekerült papíralapú dokumentumokról digitális másolatot kell készíteni és ezt követően az eredeti dokumentumot meg kell semmisíteni.

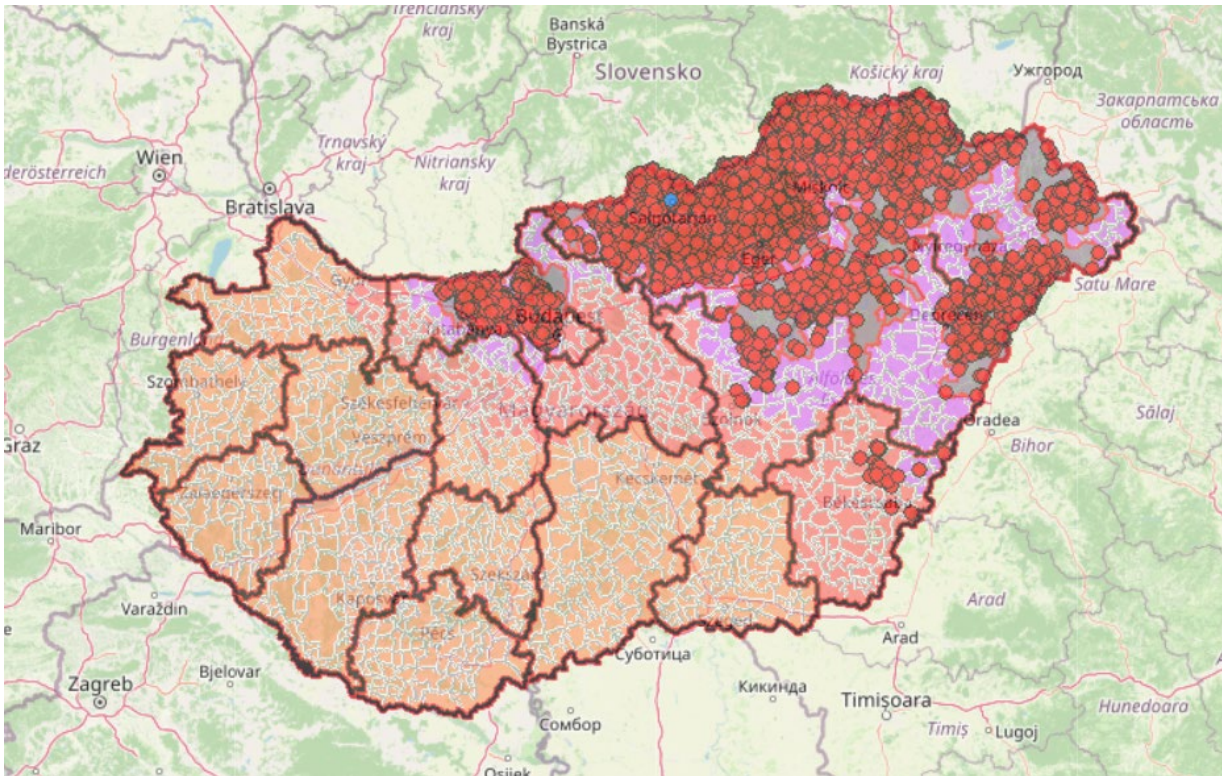


PARTNERSHIP
WITHOUT BORDERS



Az Európai Unió társfinanszírozásával készült.

Afrikai sertéspestis esetek Magyarországon



Magyarországi vaddisznó ASP esetek 2018-2023. A piros pontok valamennyi korábbi esetet, a kék pontok utolsó heti legújabb eseteket jelentik. A fertőzött területek lilák, a magas kockázatú területek pirosak, a narancssárga területek közepes kockázatúak. A kép forrása NÉBIH interaktív térkép:

<http://airterkep.nebih.gov.hu/aiijo/asp/asp.htm>

Magyarországon az első esetet 2018. április 21-én állapították meg egy heves vármegyei elhullott vaddisznóban. Az izolátum a p72, a p54 és a B602L gének nukleotid sorrendjének vizsgálata alapján 99-100 % azonosságot mutatott a Georgia 2007 törzzsel. A vírust feltételezhetően a környéken tevékenykedő vendégmunkások hurcolták be. 2018. május 14-én egy elhullott vaddisznót találtak a szabolcs-szatmár-bereg vármegyei Tiszakerecseny közelében 1 km-re az ukrán határtól. Az esetből izolált vírus 100 %-ban megegyezett a heves vármegyei vírussal. A vírus a vadállomány természetes mozgásával ukrán területekről kerülhetett Magyarországra. Szeptember végén a borsod-abaúj-zemplén vármegyei Tarcal területén egy egészséges, állománygyerítés céljából kilőtt vaddisznóban került a fertőzés megállapításra. 2018. október 28-án már a nógrád vármegyei Pásztó környékén talált vaddisznóhulla is fertőzötté vált. A vírus fokozatosan terjedt az országban és 2019. április 28-án a hajdú-bihar vármegyei Nyírábrány határában elhullott vaddisznótetemből, 2019. augusztus 21-én egy szintén heves vármegyei település (Poroszló) környékén talált hullából, néhány nappal később ismét borsod-abaúj-zemplén vármegyében (Tiszakeszi) elhullott vaddisznóból mutatták ki a vírust. 2019. augusztus 28-ra Jász-

Nagykun-Szolnok vármegye is fertőzötté vált. 2019. szeptember 28-án egy korábban alacsony kockázatúnak minősített pest vármegyei bekerített vaddisznóállományban (Budaörs/Budakeszi) talált hullában jelent meg a vírus, mely a feltételezések szerint a turistaforgalommal bekerült élelmiszerhulladékból származott. 2019. december 9-én a Romániával határos békés vármegyében Biharugra környékén talált elhullott vaddisznó is a vadállomány természetes mozgása következtében fertőződött. 2020. február 15-én a vírust kimutatták a komárom-esztergom vármegyében elhullott vaddisznóból is, ide is a szomszédos pest vármegyei fertőzött területekről a vaddisznók mozgása révén terjedt át a vírus. 2021. augusztus 10-én egy a Fejér vármegye északi részén elhullott vaddisznóból mutatták ki a vírust. A fertőzés ebben az esetben is a néhány km-re lévő komárom-esztergom vármegyei vaddisznók vándorlása következtében alakult ki.

Afrikai sertéspestis házisertésekben még nem állapítottak meg Magyarországon. A fejér vármegyei eset óta vaddisznókban sem terjedt át fertőzés újabb vármegyék területére Magyarországon (27, 28, 29, 36).

Az alkalmazott járványvédelmi és kockázatcsökkentő intézkedések hatékonysága következtében, a magyarországi Jász-Nagykun-Szolnok, Pest és Békés vármegye bizonyos körzeteiben az elmúlt tizenkét hónapban nem fordult elő az afrikai sertéspestis tartott és vadon élő sertésfélékben, ezért enyhítettek a kockázati besoroláson, míg Jász-Nagykun-Szolnok, Bács-Kiskun és Csongrád-Csanád vármegye bizonyos körzeteit kivonták a korlátozás alá eső területek közül (1, 2, 77).

1. számú melléklet: Minta előkészítés, homogenizálás, inaktiválás, heated-off board lysis nukleinsav kivonás (IndiMag Pathogen kit KingFisher heated OFF-BOARD lysis nukleinsav kivonáshoz)

A szervminták előkészítése:

Biztonsági fülkében csapágygolyóval ellátott 2 ml-es eppendorf csőbe vágjon 0,1-0,5 g szervet (véralvadék, lép, nyirokcsomó, tonzilla). Az egy állatból származó szerveket elegyítheti is (szerv mix), a csontmintát önállóan vizsgálja, a többi szervvel ne elegyítse. Vérsavó (alvadásban nem gátolt vér) esetében savóból pipettázzon ki 200-1000 µl-t eppendorf csőbe, vagy nagyszámú minta esetén mikrokémcsőbe. A szervmix (véralvadék, lép, nyirokcsomó, tonzilla) mindegyikéhez mérjen 1,0 ml steril PBS-t, majd a mixet tartalmazó csöveket helyezze a TissueLyser homogenizáló készülékbe. Rázassa a mintákat 3 percig 25 Hz/perc frekvencián; szilárdabb minták esetében ismételje meg a rázatást még egyszer. A csöveket helyezze át a centrifugába, majd centrifugálja 10 percig, 8.000 rpm fordulaton.

A szervminták hígítása, inaktiválása

A lízis puffer+Proteinase K solution kimérése egy külön helyiségben történik, ahonnan az átdadó ajtón keresztül adja a zárt laboratóriumba. Biztonsági fülke alatt az elegyből mintánként mérjen ki 520 µl-t csavaros mikrokémcsőbe. Adjon az elegyhez 160 PBS-t, végül pipettázzon 40 µl felülúszót (a savót ne hígítsa, ezért a savóból 200 µl mérjen). Termoblokkban 72 °C-on 30 percig inkubálja, majd az átdadó ablakban mérítse 15 percre 10 x hígított Virocid oldatba, ügyeljen arra, hogy a folyadék a merítőkosarat teljesen ellepje és az átdadó belsejéhez ne érjen. A nukleinsav kivonást a KingFisher Flex nukleinsav kivonó készülékkel folytassa a KF_Flex_cador 96 DW programon.

Alvadásgátolt minták előkészítése, homogenizálása

Az alvadásgátolt vérmintákat többszöri átforgatással homogenizálja. Biztonsági fülke alatt mintánként mérjen 200 µl-t a mintabemérő megfelelő mélyedéseibe. Az így előkészített mintákhoz mérjen 520 µl-t a lízis puffer+Proteinase K solution-ból.

A nukleinsav kivonást a KingFisher Flex nukleinsav kivonó készülékkel folytassa a KF_Flex_cador 96 DW programon.

2. számú melléklet: Az ASP vírusának kimutatása real-time PCR módszerrel (Virotype ASFV 2.0 PCR Kit)

Az ASP vírusának kimutatása real-time PCR módszer elve

A vizsgálat során az ASP vírusgenom p72 régiójára tervezett primerek és probe-ok segítségével polimeráz láncreakcióval (PCR) mutathatók ki a vírustörzsek, illetve azok genomja. A reakció során a fluoreszcencia intenzitás változásának detektálásával a reakció közben ún. valós időben mérhető az amplikon(ok) mennyisége. Különböző szekvencia specifikus probe-ok használatával a keletkezett termékek minőségileg is elkülöníthetők. A Virotype ASFV 2.0 PCR Kit három különböző primer/probe kombinációt tartalmaz. Az ASPV jelzésére a FAM (470-510 nm), a belső kontroll (a sertés eredetű anyagokban mindig jelen lévő fehérje génjének, béta-aktin) jelzésére a HEX (530-555 nm), az exogén internal kontroll (a minta feldolgozás során mi adjuk a lízis pufferhez) jelzésére a Cy5 (650-670 nm) tartalmú probe-ok szolgálnak. A belső kontroll és az exogén internal kontroll jelzik a fals negatív reakciók előfordulását. A pozitív kontroll a reakció elegy működőképességének ellenőrzésére szolgál.

A vizsgálathoz szükséges eszközök

A vizsgálat elvégzéséhez szükség van hűthető centrifugára, mikrocentrifugára, homogenizálóra (TissueLyser), vortexre, biológiai biztonsági fülkékre, PCR munkaállomásra, pipettákra (0,2, 10, 20, 100, 200, 1000 µl), steril, szűrős pipettahegyekre (10, 20, 50, 100, 200, 1000 µl), mintatartókra, PCR cső tartókra, steril real-time PCR csövekre/csíkokra/lemezekre/korongokra és a lefedésre szolgáló kupakokra, vagy fóliákra, különböző méretű steril centrifuga/mikrocentrifuga csövekre, gumikesztyűre, fóliázó készülékre, nukleinsav kivonó robotra (pl. KingFisher Flex), pipettázó robotra (pl. Qiagility), Q-PCR készülékre (pl. Rotor Gen Q real-time PCR, Aria Mx real-time PCR).

A vizsgálat menete

A Virotype ASFV 2.0 PCR Kit alkalmas valamennyi genotípus egyidejű kimutatására. A DNS instabilitása miatt folyamatosan, lehetőleg megszakítás nélkül végezze a reakcióelegy összeállítását. A felolvasztást hűtőben, fénytől védve végezze. A kimérés alatt is tartsa a master mixet, a kontrollokat és a mintákat jégakkun. A PCR mix kimérését és a negatív kontroll bemérését a PCR laboratóriumrész elkülönített, zárt helyiségében, (ún. tiszta szoba), vagy PCR boxban végezze. A reakcióelegy előkészítő helyiségbe történő belépés előtt köpenyt kell cserélni, a master mix kimérés alatt egyszerűhasználatos kesztyűt kell viselni (kizárólag csak itt használható, feltűnő színű). A master mixet az átadó ablak (melyet egyébként zárva kell tartani) túoldalán lévő tartókba

átrakva adja ki. A Reakcióelegy előkészítő helyiségbe mintát, kontrollt (pozitív, negatív), vagy PCR terméket bevinni nem szabad. A pozitív kontroll és a minták bemérését a tiszta szobán kívül, lamináris fülkében végezze. Többszöri felengedés-lefagyasztás csökkenti a reakció érzékenységét, ezért, ha kicsi a mintaszám a reakcióelegyet (master mix) és a kontrollokat aliquot-olni kell.

Egy reakcióhoz 20 µl master mixet és 5 µl minta nukleinsavat mérjen. A master mix kiszámolásánál a vizsgálandó minták számán kívül vegye figyelembe a pozitív és a negatív kontrollok számát és a mérési veszteséget is (plusz 1-2 reakció).

A PCR vizsgálathoz töltsse ki a megfelelő űrlapot, vagy jegyzőkönyvet. Adagoljon mintánként 20 µl-t a master mixből (narancs tetejű, tartalmazza az enzimeket, primereket, probe-okat) a PCR csövekbe, majd mérjen be 5 µl-t a kivont DNS-ből. A Virotype ASFV 2.0 PCR Kit tartalmazza a pozitív kontrollt, (piros tetejű) és a negatív kontrollt is (kék tetejű), mindkét kontroll esetén 5 µl-t mérjen a minta helyett. A reakcióelegy összeállítása kézi pipetázással, vagy nagyszámú minta esetén automatizált robotokkal végezhető.

PCR program lépései

enzim aktiválás 95 °C 2 perc

denaturálás 95 °C 5 mp

primer tapadás, szintézis 60 °C* 30 mp 40 ciklus.

*: fluoreszcens jelek detektálása zöld, sárga és piros csatornákon.

A mixben található fluoreszcens jelet adó festékek különböző hullámhosszon mérhető fluoreszcens jelet adnak. A műszerszobában a megfelelő PCR készülékek megfelelő programjának kiválasztása után indítsa el a reakciót.

A vizsgálati eredmények értékelése:

A **vizsgálat érvényes**, ha a pozitív kontroll a 35. ciklus előtt jelet ad mind a három csatornán és a negatív kontroll egyik csatornán sem ad jelet.

A minta **ASPV pozitív és a vizsgálat érvényes**, ha a következő kritériumok teljesülnek: A minta a 35. ciklus előtt jelet ad a FAM csatornán (tekintet nélkül arra, hogy adott-e jelet a HEX vagy/és Cy5 csatornán, ha a minta nagymennyiségű ASPV DNS-t tartalmaz, akkor az kizoríthatja a kontrollokat). A pozitív kontroll mind a három csatornán jelet ad a 35. ciklus előtt. A negatív kontroll egyik csatornán sem ad jelet a 35. ciklus előtt.

A minta **ASPV negatív a vizsgálat érvényes**, ha a következő kritériumok teljesülnek: A minta a 35. ciklus előtt nem ad jelet a FAM csatornán. A minta a 35. ciklus előtt jelet ad a HEX és a Cy5 csatornán is. A pozitív kontroll mind a három csatornán jelet ad a 35. ciklus előtt. A negatív kontroll egyik csatornán sem ad jelet a 35. ciklus előtt.

Az **eredmény értékelhetetlen és a vizsgálat érvénytelen**, ha a minta egyik csatornán sem ad jelet a 35. ciklus előtt.

Tekintettel arra, hogy valamennyi sertés sejtben megtalálható a háztartási gén (béta-aktin) a HEX csatornán a jel elmaradása a nukleinsav kivonás sikertelenségére, vagy a mintában eleve kevés kivonható nukleinsav jelenlétére utal. PCR gátló anyagok esetén a Cy5 csatornán is elmarad a jel. Tapasztalataink szerint a fertőtlenítőszer maradékok jelenléte, talajszennyeződés, autolízis is okozhatja a nukleinsav kivonás és a PCR reakció sikertelenségét. Ilyen esetekben a minta hígításával (1:5, 1:10), és/vagy új nukleinsav kivonással próbálkozhatunk. Ha a pozitív kontroll valamelyik csatornán nem ad jelet a 35. ciklus előtt, az a reakcióelegy nem megfelelő összeállítását, a bemérés vagy a reakciókörülmények hibáját jelezheti, ebben az esetben is meg kell ismételni a reakciót.

3. számú melléklet: Az afrikai sertéspestis vírusával szembeni ellenanyagok kimutatása ELISA-val (Ingezim PPA Compac K3 ELISA teszt)

Az ELISA módszer elve

Az ELISA lemezt inaktivált, tisztított p72 ASPV struktúrfehérje antigénnel érzékenyítették. A vizsgálandó vérsavó hozzáadása után a p72 APFV fehérjével szemben termelt monoklonális ellenanyaggal jelölt peroxidáz konjugátumot mérjük be. Végül a színreakció kialakuláshoz szükséges szubsztrátot adjuk a reakcióhoz. Amennyiben a mintában van ASPV specifikus ellenanyag, az gátolni fogja a p72 ASPV fehérjével szemben termelt monoklonális ellenanyaggal jelölt peroxidáz konjugátum antigénhez történő kötődését. Ha a minta nem tartalmaz specifikus ellenanyagokat, a gátlás elmarad. A közbeiktatott mosási lépésekkel a meg nem kötött anyagokat eltávolítjuk. A szubsztrát hozzáadása után a kialakult színreakcióból következtetünk az ellenanyag jelenlétére vagy hiányára.

A vizsgálatához szükséges eszközök

Az előkészítéshez és a vizsgálatokhoz pipettára, többcsatornás pipettára (50, 100, 300, 1000 µl), steril műanyag pipetta hegyekre, centrifugára, mikrokémcsövekre, mérőhengerre, hűtőszekrényre, ELISA mosóra, ELISA leolvasóra, papírvattára, 37 °C-os termosztátra, reagens tálkára, percjelző órára van szükség.

A vizsgálat menete:

Az előkészítés során vegye elő a szükséges mennyiségű lemezt és a reagenseket, és hagyja azokat szobahőmérsékletre (20-25 °C) felmelegedni. Hígítsa a mosóoldat koncentrátumot 25 x-re desztillált, vagy ioncserélt vízzel (1 rész mosóoldat koncentrátum 24 rész vízhez). A kész oldat 2-8 °C-on tárolható. A kontroll szérumokat a mintákhoz hasonlóan 1:2 arányban hígítsa a megadott mintahígítóval a lemezen. Közvetlenül a felhasználás előtt hígítsa 100 x-ra a konjugátumot a hígító oldattal. Mindig csak a szükséges mennyiséget hígítsa, a fel nem használt konjugátum oldat nem tárolható! A hígító oldat, a szubsztrát puffer és a leállító oldat felhasználásra kész. A savómintákat 1:2 arányban kell a savóhígítóval hígítani. A hígítást elvégezheti közvetlenül a lemezen is (50 µl hígító + 50 µl savó mélyedésenként).

A vizsgálat során mérjen 50 µl hígítót minden vájulatba. Mérjen 50 µl pozitív és negatív kontrollt két-két vájulatba, a mintákból mélyedésenként 50 µl-t mérjen. Fedje le a lemezt és inkubálja 36 ± 1 °C-on 1 órán (± 5 min) át, vagy 20-25 °C-on 16-20 órán (egy éjszakán) át. Az inkubálást követően ürítse ki a lemezt és mossa 4 alkalommal, úgy hogy a lemezből a benne lévő folyadékot egy határozott mozdulattal öntse ki és a vájatosokat

mosóoldattal töltse fel (300 µl/vájat), ügyelve, hogy ne képződjön légbuborék. A mosófolyadékot ismét hirtelen mozdulattal távolítsa el a vájatokból. Ezt még háromszor ismétlje meg. A negyedik mosást követően a lemezt (stripet) lefelé fordítva, erőteljesen, papírvattán szárazra kell ütögetni. A lemezt óvja a kiszáradástól a mosások között és a következő reagens beméréséig. A hígított konjugátumból adjon 100 µl-t mindegyik vájulatba, majd fedje le a lemezt és inkubálja 30 percig 36 ± 1 °C-on. Mossa ki a lemezt ötször az előzőekben leírtaknak megfelelően. Adjon 100 µl szubsztrát oldatot mindegyik vájulatba, inkubálja szobahőmérsékleten 15 percig 20-25 °C-on. A reakciót 100 µl szobahőmérsékletre előmelegített leállító oldattal állítsa le. A leállító oldatot lehetőleg ugyanolyan sorrendben és sebességgel pipettázza, ahogy az a szubsztráttal történt. Az eredményeket fotométerrel, 450 nm-es hullámhosszon, a reakció leállítását követő 5 percen belül olvassa le.

A próba értékelése

A próba értékelhető, ha a negatív kontroll OD értéke (NC) legalább négyszer nagyobb, mint a pozitív kontrollé (PC). A minták értékeléséhez szükséges cut off érték kiszámítása a következő képlettel történik: Pozitív cut off = $NC - [(NC - PC) * 0,5]$, Negatív cut off = $NC - [(NC - PC) * 0,4]$

A minta értékelése

Pozitív az a minta, melynek OD értéke a pozitív cut off értékénél alacsonyabb. Negatív az a minta, melynek OD értéke a negatív cut off értékénél magasabb. A két érték között az eredmény kétesnek számít.

Az ELISA vizsgálatok a hemolizált, nagyfokban szennyezett minták esetében téves pozitív reakciót adhatnak.

4. számú melléklet: Az afrikai sertéspestis vírusával szembeni ellenanyagok kimutatása ELISA-val (ID Screen® African Swine Fever Indirect Confirmation Test)

Az ELISA módszer elve

Az ELISA lemez páros számú oszlopait az ASPV p32, p62 és p72 rekombináns fehérjével érzékenyítették, míg a kontrollként szolgáló páratlan számú oszlopok nem érzékenyítettek. A vizsgálandó vérsavó mindkét oszlopba történő bemérése után, amennyiben a mintában van ASPV specifikus ellenanyag, az kötődni fog a lemezen lévő rekombináns fehérjékkel. A peroxidázzal jelölt anti-multi-species ellenanyag konjugátum és a színreakció kialakuláshoz szükséges szubsztrát hozzáadása után színreakció alakul ki. A közbeiktatott mosási lépésekkel a meg nem kötött anyagokat eltávolítjuk. Természetesen a kontroll oszlopokban mivel nem tartalmaznak antigént nem alakul ki színreakció. Az érzékenyített oszlop színintenzitása és a kontroll oszlop színintenzitása különbségéből kalkulált színerősség mértékéből következtetünk az ellenanyag jelenlétére vagy hiányára. Ha vannak ellenanyagok kék reakció alakul ki, amely a stoppoló hozzáadása után sárgává válik, ellenanyagok hiányában nincs színreakció.

A vizsgálathoz szükséges eszközök

Az előkészítéshez és a vizsgálatokhoz pipettára, többcsatornás pipettára (50, 100, 300, 1000 µl), steril műanyag pipetta hegyekre, centrifugára, mikrokémcsövekre, mérőhengerre, hűtőszekrényre, ELISA mosóra, ELISA leolvasóra, papírvattára, 37 °C-os termosztátra, reagens tálkára, percjelző órára van szükség.

A vizsgálat menete

A konjugátumot, a kontrollokat és a szubsztrátot 5 ± 3 °C-on kell tárolni. Az egyéb reagensok 2-26 °C között tárolhatók. Az azonos nevű termékek az IDVET termékcsaládban szabadon felhasználhatók. Felhasználás előtt meg kell várni, amíg a reagensok eléri a szobahőmérsékletet (21 ± 5 °C), majd a reagenseket jól keverje össze. Ha szükséges hagyja szobahőmérsékletűre melegedni a mosóoldat koncentrátumot (Wash Concentrate 20x) keverje össze, majd hígítsa 20 x desztillált vízzel.

Mérjen 190 µl-t a Dilution Buffer 14-ből és 10 µl-t a negatív kontrollból az A1, A2, B1, B2 melyedésekbe. Mérjen 190 µl-t a Dilution Buffer 14-ből és 10 µl-t a pozitív kontrollból C1, C2, D1, D2 melyedésekbe. Végül mérjen 50 µl-t a Dilution Buffer 14-ből és 50 µl-t minden egyes vizsgálandó savóból az antigénnel fedett páros és a fedetlen páratlan oszlopokba. Inkubálja a lefedett lemezt 45 (± 4) percig szobahőmérsékleten (21 ± 5 °C). Inkubálás után az előzetesen 1:20-ra hígított 300 µl mosóoldattal (Wash Solution) 3-szor mossa a

lemezeket. Hirtelen megfordítva a lemezt, öntse ki annak tartalmát és töltsön mindegyik vájatba legalább 300 µl mosóoldatot. Rázza ki alaposan a lemezből a mosóoldatot, majd papírvattán ütögesse szárazra, azonban kerülje el a lemez teljes kiszáradását. A konjugátum hígító pufferrel (Dilution Buffer 3) 1:10-re kell hígítani a konjugátumot (Concentrated Conjugate (10x)). A hígított konjugátumot azonnal fel kell használni. Mérjen 100 µl-t az előzetesen konjugátum hígítóval (Diluent Buffer 3) 1:10-re hígított konjugátumból (Concentrated Conjugate (10x)) minden felhasznált vájatba. Inkubálja a lefedett lemezt 30 (±3) percig szobahőmérsékleten (21 ± 5 °C). Ismétlje meg a mosási lépést. Mérjen 100 µl szubsztrátot (Substrate Solution) minden felhasznált vájatba. Inkubálja a lefedett lemezt sötét helyen 15 (± 2) percig szobahőmérsékleten (21 ± 5 °C). A reakció leállításához mérjen 100 µl leállító oldatot (Stop Solution) minden felhasznált vájatba. Mérje le a kontrollok és a minták színintenzitását (OD értékét) 450 nm-es hullámhosszon fotométer segítségével.

A próba értékelése

Az eredmények értékeléséhez meg kell határozni a nettó OD értéket:

net OD = OD even well - OD odds well. A próba értékelhető, ha a pozitív kontroll net OD értékének átlaga nagyobb mint 0,35 és a pozitív kontroll net OD értéke átlagának és a negatív kontroll net OD értéke átlagának a hányadosa nagyobb mint 3.

A minták értékelése

A minták kiértékelését a kapott net OD értékek alapján végezzük, melyhez az alábbi képlettel kiszámoljuk az S/P értéket.

$$\frac{OD_{\text{sample}} - OD_{\text{nc}}}{OD_{\text{pc}} - OD_{\text{nc}}} = \frac{S}{P} \%$$

A minta **negatív**, ha az S/P értéke kisebb, mint 0,3,

pozitív, ha az S/P értéke nagyobb, vagy egyenlő mint 0,4,

kétes a minta, ha az S/P értéke 0,30 és 0,4 között van.

5. számú melléklet: Fertőtlenítés a Debreceni Immunológiai, Virologiai és TSE Laboratóriumban

1. Fertőző anyagok kezelése: A vizsgálatok végeztével veszélyes anyagként kell kezelni és a kizárólag erre a célra használt badellákba kell gyűjteni: a vizsgálati anyagokat (boncolóból felküldött) és/vagy közvetlenül a laboratóriumba érkezett szerveket, tamponmintákat, váladékokat, ezek maradványát és edényzetét; a vér(savó) mintákat és a vérvételi edényzetet; a fertőzött anyagokat tartalmazó edényzetet és annak tartalmát; az egyszer használatos pipettahegyeket; a kitek és valamennyi diagnosztikai reagens felhasználása során keletkezett termékeket, anyagokat és azok esetlegesen fel nem használt maradványát; a vizsgálatok során keletkezett anyagokat (ELISA mosóoldat, centrifugálás utáni maradvány); a vizsgálatok során elhasznált (szennyezett, fertőzött) védőeszközöket, védőruházatot.
2. Mintatartó tálcák, fém, vagy műanyag állványok, mérőhenger, törzsoldat-tároló üveg kezelése: Háztartási mosogatószeres vízzel mossuk, szükség szerint 6 %-os H-lúg oldattal fertőtlenítjük, öblítjük, szárítjuk.
3. Kézi műszer (olló, csipesz) kezelése: 1-2 órán át 1 %-os Virocid oldatban áztatjuk, csapvízzel alaposan előblítjük, 1,2 atmoszférai nyomáson, 20 percen át, 121 °C-on autoklávozzuk.
4. Levegőfertőtlenítés: A levegő fertőtlenítése érdekében a takarítás, a fertőtlenítés és a munkaterület elhagyása után a műszerekben és a helyiségek mennyezetén elhelyezett higanygőz lámpákat (napi 1-4 órára) időkapcsolóval vezérelve be kell kapcsolni. Csak az ultraibolya lámpa kikapcsolása és szellőztetés után szabad a helyiségekben ismételt munkát végezni.
5. Felületfertőtlenítés: A munka befejezése után minden nap a munkafelületeket, eszközöket, műszereket, továbbá minden olyan felületet, amely a munkavégzés során fertőződhetett, fertőtleníteni kell. A látható szennyeződéstől megtisztított felületekre a Vantropol rapid fertőtlenítő oldatot papír törölkendővel visszük fel. A nehezen tisztítható, fertőtleníthető helyeket, a műszerek belső felületeit a Vantropol rapid fertőtlenítő spray-vel fújuk le. Az egyéb módon nem, vagy nehezen mentesíthető felületeket DNA AWAY és RN-ase AWAY decontamináló oldattal naponta át kell törölni. A laboratóriumi helyiségek padlóját minden nap munka után fertőtlenítőszeres vízzel fel kell mosni.
6. Személyi higiénia: Kézfertőtlenítést kell végezni a kesztyű levétele után; a laboratórium elhagyásakor; WC használat előtt és után; biztonsági fülkében végzett munka előtt és után; a kéz munkavégzés közbeni szennyeződésekor; a napi munka befejeztével. Langyos

szappanos vízzel alaposan kezet mosunk, a kezeket egyszer-használatos papírtörülközővel szárazra töröljük, majd egyik kézbe kb. 5 ml kézfertőtlenítő oldatot veszünk, azt a kézfejekon, szükség esetén az alkaron egyenletesen eldörzsöljük és rajta hagyjuk az előírt behatási ideig. Tisztasági kézmosás, kéztörlés után 2 x 1,5 perc BradoDerm Soft oldat.

7. A klímaberendezéseket a karbantartást végzőkkel évente fertőtleníteni kell.
8. Véletlen kiömlés esetére valamennyi laboratóriumi helyiségben 10 x hígított Virocid oldatot kell tartani.
9. Fertőtlenítésre a Virocid oldat helyett hasonló koncentrációban és behatási idővel a Perfect kombicid oldat is használható.

Az afrikai sertéspestissel és a laboratóriumi kórjelzéssel kapcsolatos fontosabb jogszabályok

Európai Unió szabályok:

Az Európai Parlament és a Tanács (EU) 2016/429 rendelete (2016. március 9.) a fertőző állatbetegségekről és egyes állategészségügyi jogi aktusok módosításáról és hatályon kívül helyezéséről („Állategészségügyi rendelet”) *OJ L 84, 31.3.2016, p. 1–208*, <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HU/TXT/?uri=celex%3A32016R0429>.

A Bizottság (EU) 2018/1629 felhatalmazáson alapuló rendelete (2018. július 25.) a betegségeknek a fertőző állatbetegségekről és egyes állategészségügyi jogi aktusok módosításáról és hatályon kívül helyezéséről szóló (EU) 2016/429 európai parlamenti és tanácsi rendelet („állategészségügyi rendelet”) II. mellékletében szereplő jegyzékének módosításáról. http://data.europa.eu/eli/reg_del/2018/1629/oj.

A Bizottság (EU) 2018/1882 végrehajtási rendelete (2018. december 3.) egyes betegségmegelőzési és járványvédelmi szabályoknak a jegyzékbe foglalt betegségek kategóriáira történő alkalmazásáról, valamint a jegyzékbe foglalt betegségek terjedésére nézve számottevő kockázatot jelentő fajok és fajcsoportok jegyzékének megállapításáról. http://data.europa.eu/eli/reg_impl/2018/1882/oj.

A Bizottság (EU) 2020/687 felhatalmazáson alapuló rendelete (2019. december 17.) az (EU) 2016/429 európai parlamenti és tanácsi rendeletnek a bizonyos jegyzékbe foglalt betegségek megelőzésére és az e betegségekkel szembeni védekezésre vonatkozó szabályok tekintetében történő kiegészítéséről. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HU/TXT/HTML/?uri=CELEX:02020R0687-20210714&qid=1673784660292&from=hu>.

A Bizottság (EU) 2023/594 végrehajtási rendelete (2023. március 16.) az **afrikai sertéspestisre** vonatkozó különleges járványvédelmi intézkedések megállapításáról és az (EU) 2021/605 végrehajtási rendelet hatályon kívül helyezéséről. <https://eur-lex.europa.eu/legal->

[content/HU/TXT/?uri=CELEX:02023R0594-20230516&qid=1689368504223](https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HU/TXT/?uri=CELEX:02023R0594-20230516&qid=1689368504223).

Ennek a rendeletnek a mellékletét folyamatosan módosítják, pl. A Bizottság (EU) 2023/1300 végrehajtási rendelete (2023. június 22.) az afrikai sertéspestisre vonatkozó különleges járványvédelmi intézkedések megállapításáról szóló (EU) 2023/594 végrehajtási rendelet I. mellékletének módosításáról http://data.europa.eu/eli/reg_impl/2023/1300/oj. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HU/TXT/HTML/?uri=CELEX:32023R1300&qid=1689369991143>.

Scientific Opinion on the African swine fever in wild boar.

<https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2018.5344>

Scientific report on the epidemiological analyses of African swine fever in the European Union (November 2018 to October 2019), *EFSA Journal* 2020;18(1):5996, 107 pp.

<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.5996>

Scientific Opinion on the assessment of the control measures of the category A diseases of Animal Health Law: African Swine Fever,

<https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2021.6402>.

Magyar jogszabályok:

98/2003. (VIII. 22.) FVM rendelet az afrikai sertéspestis elleni védekezésről,

<https://net.jogtar.hu/jogszabaly?docid=a0300098.fvm>.

2008. évi XLVI. törvény az élelmiszerláncról és hatósági felügyeletéről,

<https://net.jogtar.hu/jogszabaly?docid=a0800046.tv>

Az Országos Főállatorvos 2/2021. számú határozata,

https://portal.nebih.gov.hu/documents/10182/902001/2_2021_OFA_határozat.pdf.

Országos afrikai sertéspestis készenléti terv,

<https://portal.nebih.gov.hu/documents/10182/458753/Afrikai+sert%C3%A9spestis+k%C3%A9szenl%C3%A9ti+terv+20190731.pdf/a7c74fc6-cb91-6465-6ba5-c412c26e9510>).



**PARTNERSHIP
WITHOUT BORDERS**



Laboratóriumokra vonatkozó előírások:

World Organisation for Animal Health (WOAH) Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2021 Chapter 3.9.1 African Swine Fever

(https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.08.01_ASF.pdf).

The European Union Reference Laboratory for African Swine Fever (EURL-ASF),

<https://asf-referencelab.info/asf/en/>.

African Swine Fever Detection and Diagnosis, <https://www.fao.org/3/i7228e/i7228e.pdf>.

Ajánlások, műveleti utasítások, útmutatók, <https://asf-referencelab.info/asf/en/procedures-diagnosis/diagnostic-procedures>,

<https://asf-referencelab.info/asf/en/procedures-diagnosis/sops>.

A Bizottság 2003/444/EK határozata az afrikai sertéspestis diagnosztikai kézikönyvének jóváhagyásáról. Jogilag már nem hatályos, (érvényesség vége: 2021. 04. 20.) azonban szakmailag nagyon sok javaslatot tartalmaz.

Akkreditációs dokumentumok, belső szabályzatok, utasítások, diagnosztikai reagensek felhasználási utasításai, műszerek kezelési útmutatói (ELISA, Virotype ASP 2.0 PCR kit, IndiMAG Pathogen kit, stb.).

Az **Állategészségügyi rendelet** (az Európai Parlament és a Tanács (EU) 2016/429 rendelete) a betegségek elleni védekezés területén a korábbi nagyszámú állategészségügyi jogszabály helyett egy új, átfogó, egységes (az Európai Parlament és az Európai Unió Tanácsa által alkotott) rendeletként jelenik meg. A Bizottsági végrehajtási rendeletek (EU 2018/1629; 2018/1882) a járványügyi kockázatok alapján jegyzékbe foglalnak betegségeket, érintett állatfajokat és kategóriákba sorolják ezeket a legfontosabb fertőző betegségeket az EU-helyzet, más állatokra és a közegészségre (zoonózis) gyakorolt hatás alapján. A rendelet kötelezi a tagállamokat, hogy készítsenek készenléti tervet bizonyos betegségek kezelésére, előírja a szabályokat, hogy valamely betegség igazolt vagy feltételezett kitörése esetén milyen intézkedéseket kell tenni. Szabályozza az állatszállításokat mind a behozatal, mind pedig a kivitel tekintetében, meghatározza a vészhelyzet esetén követendő eljárásokat. Rögzíti minden olyan

szereplő kötelezettségét, akinek szerepe van az állatok egészségének megóvásában, tisztázza az állategészségügy kapcsán előírt bejelentési és megfigyelési kötelezettségeket (állatorvosok, mezőgazdasági termelők, hatóságok).

Az Állategészségügyi rendelet struktúrája és tartalma:

1. rész – Általános szabályok (betegségek listája, betegségek kategorizálása)
2. rész – A betegségek bejelentése és az azokkal kapcsolatos jelentéstétel, felügyelet, mentesítési programok és „betegségtől mentes” minősítés (betegség-felügyelet, betegség-felszámolás, betegség-mentesség státusz)
3. rész – A betegségekkel kapcsolatos tudatosság, felkészültség és védekezés (megelőzés és járványvédelmi intézkedés (disease control) A, B és C kategóriás betegségek: állatgyógyászati készítmények, vakcinák használata: járványvédelmi intézkedések: készenléti tervek
4. rész – Nyilvántartásba vétel, engedélyezés, nyomon követhetőség és mozgatás A. - szárazföldi állatok, szaporítóanyagok és szárazföldi állatoktól származó állati eredetű termékek B. - víziállatok és víziállatoktól származó állati eredetű termékek
5. rész – Az Európai Unió területére való beléptetés és kivitel
6. rész – Kedvtelésből tartott állatok nem kereskedelmi célú mozgatása
7. rész – Vészhelyzeti intézkedések
8. - 9. rész – Közös, átmeneti és záró intézkedések

A Bizottság (EU) **2020/687 felhatalmazáson alapuló rendelete** bizonyos jegyzékbe foglalt betegségek megelőzésére és a védekezésre vonatkozó szabályok kiegészítéséről.

I. rész – Általános rendelkezések; a 3. cikk foglalkozik az A kategóriájú betegség jelenlétének megállapításához vagy kizárásához szükséges „Klinikai vizsgálatok, mintavételi eljárások és diagnosztikai módszerek” szabályaival.

II. rész – Szárazföldi állatok;

Az I. fejezet a járványvédelmi intézkedések **A kategóriájú betegségek** esetén tartott szárazföldi állatoknál; a II. fejezet járványvédelmi intézkedések **A kategóriájú betegségek** esetén tartott szárazföldi állatoknál a korlátozás alatt álló körzetekben; a III. fejezet **A kategóriájú betegségeket** követően a korlátozás alatt álló körzetekben található létesítmények szárazföldi állatokkal történő újratelepítése; a IV. fejezet járványvédelmi intézkedések **A kategóriájú betegségek** jegyzékbe foglalt fajokhoz tartozó vadon élő állatok esetében; az V. fejezet

járványvédelmi intézkedések **B és C kategóriájú betegségek** esetén szárazföldi állatoknál.

III. rész – Víziállatok;

IV. rész – Záró rendelkezések, mellékletek; az I. melléklet az e rendelet 3. cikkében foglaltak szerint az A kategóriájú betegségekhez kapcsolódó klinikai vizsgálatok, mintavételi eljárások és diagnosztikai módszerek, valamint a minták szállítása kérdéseit részletezi.

A fenti rendeletek szerint:

„**A kategóriájú betegség**”: olyan jegyzékbe foglalt betegség, amely általában nem fordul elő az Unió területén és amelynek kimutatásakor azonnal mentesítési intézkedéseket kell tenni, az (EU) 2016/429 rendelet 9. cikke (1) bekezdésének a) pontjában foglaltak szerint;

„**B kategóriájú betegség**”: olyan jegyzékbe foglalt betegség, amelyre vonatkozóan valamennyi tagállamban járványvédelmi intézkedéseket kell hozni az Unió-szerte történő felszámolásuk érdekében, az (EU) 2016/429 rendelet 9. cikke (1) bekezdésének b) pontjában foglaltak szerint;

„**C kategóriájú betegség**”: olyan jegyzékbe foglalt betegség, amely egyes tagállamokat érint és amely esetében intézkedésekre van szükség ahhoz, hogy megakadályozható legyen áttejedésük az Unió hivatalosan betegségtől mentesnek minősülő vagy olyan területeire, amelyek rendelkeznek mentesítési programokkal az adott, jegyzékbe foglalt betegségre vonatkozóan, az (EU) 2016/429 rendelet 9. cikke (1) bekezdésének c) pontjában foglaltak szerint;

„**D kategóriájú betegség**”: olyan jegyzékbe foglalt betegség, amely esetében azért van szükség intézkedésre, hogy megakadályozzák az Unió területére való bejutásuk vagy a tagállamok közötti mozgatás következményeként való elterjedésüket, az (EU) 2016/429 rendelet 9. cikke (1) bekezdésének d) pontjában foglaltak szerint;

„**E kategóriájú betegség**”: olyan jegyzékbe foglalt betegség, amely esetében Unión belüli felügyeletre van szükség, az (EU) 2016/429 rendelet 9. cikke (1) bekezdésének e) pontjában foglaltak szerint.

A fenti rendeletek az afrikai sertéspestist a disznóféléket érintő A, D és E kategóriájú betegségeként sorolják fel.

Résztvétel rendezvényeken, előadások tartása

BioSecurity Conference, Hungary, Vásárosnamény előadás 2022. 02. 16.

Debrecen Laboratórium bemutatás, Hungary, Debrecen, ÁDI Debreceni Immunológiai Virologiai és TSE Laboratórium, 2022. 02. 18.

BioSecurity Conference, Workshop, Hungary, Debrecen, 2022. 04. 28.

BioSecurity Conference, Ukrajna, Ungvár online előadás 2023. 01. 26.

BioSecurity Conference, Hungary, Nyírbátor 2023.03.17.

BioSecurity Conference, Hungary, Miskolc-Tapolca 2023. 09. 13.



PARTNERSHIP
WITHOUT BORDERS



Felhasznált irodalom

1. A Bizottság (EU) 2023/1300 végrehajtási rendelete (2023. június 22.) az afrikai sertéspestisre vonatkozó különleges járványvédelmi intézkedések megállapításáról szóló (EU) 2023/594 végrehajtási rendelet I. mellékletének módosításáról (EGT-vonatkozású szöveg) ELI: http://data.europa.eu/eli/reg_impl/2023/1300/oj <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HU/TXT/HTML/?uri=CELEX:32023R1300&qid=1689369991143>
2. A BIZOTTSÁG (EU) 2023/1677 VÉGREHAJTÁSI RENDELETE (2023. augusztus 30.) az afrikai sertéspestisre vonatkozó különleges járványvédelmi intézkedések megállapításáról szóló (EU) 2023/594 végrehajtási rendelet I. mellékletének módosításáról
3. A Bizottság Határozata (2003. május 26.) Az afrikai sertéspestis diagnosztikai kézikönyvének jóváhagyásáról: 2003.6.11. L 143/35, Az Európai Unió Hivatalos Lapja, <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HU/TXT/PDF/?uri=CELEX:32003D0422>
4. African swine fever (ASF) situation update in Asia & Pacific 6 July 2023, Rome <https://www.fao.org/animal-health/situation-updates/asf-in-asia-pacific/en>
5. Agüero M, Fernández J, Romero L, Sánchez Mascaraque C, Arias M, Sánchez-Vizcaíno JM. Highly sensitive PCR assay for routine diagnosis of African swine fever virus in clinical samples. J Clin Microbiol. 2003 Sep;41(9):4431-4434. DOI: [10.1128/JCM.41.9.4431-4434.2003](https://doi.org/10.1128/JCM.41.9.4431-4434.2003)
6. Agüero M, Fernández J, Romero LJ, Zamora MJ, Sánchez C, Belák S, Arias M, Sánchez-Vizcaíno JM. A highly sensitive and specific gel-based multiplex RT-PCR assay for the simultaneous and differential diagnosis of African swine fever and Classical swine fever in clinical samples. Vet Res. 2004 Sep-Oct;35(5):551-63. DOI: [10.1051/vetres:2004031](https://doi.org/10.1051/vetres:2004031)
7. Alonso, C., Borca, M., Dixon, L., Revilla, Y., Rodriguez, F., Escribano, J.M., and ICTV Report Consortium. 2018, [ICTV Virus Taxonomy Profile: Asfarviridae](https://doi.org/10.1093/ictv/ictv18.1.613), Journal of General Virology, 99: 613–614.
8. Ana Catarina Urbano & Fernando Ferreira (2022) African swine fever control and prevention: an update on vaccine development, Emerging Microbes & Infections, 11:1, 2021-2033, DOI: [10.1080/22221751.2022.2108342](https://doi.org/10.1080/22221751.2022.2108342)
9. Andrés G, Charro D, Matamoros T, Dillard RS, Abrescia NGA. [The cryo-EM structure of African swine fever virus unravels a unique architecture comprising two icosahedral protein capsids and two lipoprotein membranes.](https://doi.org/10.1074/jbc.AC119.011196) J Biol Chem. 2020 Jan 3;295(1):1-12. doi: 10.1074/jbc.AC119.011196.
10. Ann Sofie Olesen, Jonno Jorn Stelder, Kirsten Tjørnehøj, Camille Melissa Johnston, Louise Lohse, Lene Jung Kjær, Anette Ella Boklund, Anette Bøtner, Graham J Belsham, René Bødker, Thomas Bruun Rasmussen Viruses . 2023 May 26;15(6):. Detection of African Swine Fever Virus and Blood Meals of Porcine Origin in Hematophagous Insects Collected Adjacent to a High-Biosecurity Pig Farm in Lithuania; A Smoking Gun?: DOI: [10.3390/v15061255](https://doi.org/10.3390/v15061255)
11. Atuhaire DK, Afayoa M, Ochwo S, Mwesigwa S, Mwiine FN, Okuni JB, Olaho-Mukani W, Ojok L. BMC [Prevalence of African swine fever virus in apparently healthy domestic pigs in Uganda.](https://doi.org/10.1186/1746-6148-9-263) Vet Res. 2013 Dec 26;9:263. doi: 10.1186/1746-6148-9-263.
12. Az Országos Főállatorvos 2/2021. számú határozata https://portal.nebih.gov.hu/documents/10182/902001/2_2021_OFA_határozat.pdf
13. Beato MS, D'Errico F, Iscaro C, Petrini S, Giammarioli M, Feliziani F. Disinfectants against African Swine Fever: An Updated Review. Viruses. 2022 Jun 24;14(7):1384. doi:[10.3390/v14071384](https://doi.org/10.3390/v14071384)
14. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories Personal Author(s) : Meechan, Paul J.;Potts, Jeffrey; Corporate Authors(s) : Centers for Disease Control and Prevention (U.S.);National Institutes of Health (U.S.); <https://stacks.cdc.gov/view/cdc/97733>

15. Blome S, Franzke K, Beer M. [African swine fever - A review of current knowledge](#). *Virus Res.* 2020 Oct 2;287:198099. doi: 10.1016/j.virusres.2020.198099.
16. Blome S, Gabriel C, Dietze K, Breithaupt A, Beer M. High virulence of African swine fever virus caucasus isolate in European wild boars of all ages. *Emerg Infect Dis.* 2012 Apr;18(4):708. DOI: [10.3201/eid1804.111813](#).
17. Blome S, Goller KV, Petrov A, Dräger C, Pietschmann J, Beer M.: [Alternative sampling strategies for passive classical and African swine fever surveillance in wild boar--extension towards African swine fever virus antibody detection](#). *Vet Microbiol.* 2014 Dec 5;174(3-4):607-608. doi: 10.1016/j.vetmic.2014.09.018.
18. Bonnet, Sarah I., Emilie Bouhsira, Nick De Regge, Johanna Fite, Florence Etoré, Mutien-Marie Garigliany, Ferran Jori, Laetitia Lempereur, Marie-Frédérique Le Potier, Elsa Quillery, and et al. 2020. "Putative Role of Arthropod Vectors in African Swine Fever Virus Transmission in Relation to Their Bio-Ecological Properties" *Viruses* 12, no. 7: 778. <https://doi.org/10.3390/v12070778>
19. Braae UC, Johansen MV, Ngowi HA, Rasmussen TB, Nielsen J, Uttenthal Å,: Detection of African swine fever virus DNA in blood samples stored on FTA cards from asymptomatic pigs in Mbeya region, Tanzania. *Transbound Emerg Dis.* 2015 Feb;62(1):87-90. doi: 10.1111/tbed.12074.
20. C Carrillo, M V Borca, C L Afonso, D V Onisk, D L Rock: Long-term persistent infection of swine monocytes/macrophages with African swine fever virus *J Virol.* 1994 Jan;68(1):580-3. DOI: [10.1128/JVI.68.1.580-583.1994](#)
21. Claire Guinat, Ana Luisa Reis, Christopher L Netherton, Lynnette Goatley, Dirk U Pfeiffer, Linda Dixon, Dynamics of African swine fever virus shedding and excretion in domestic pigs infected by intramuscular inoculation and contact transmission *Vet Res .* 2014 Sep 26;45(1):93. DOI: [10.1186/s13567-014-0093-8](#)
22. Claire Guinat, Andrey Gogin, Sandra Blome, Guenther Keil, Reiko Pollin; Transmission routes of African swine fever virus to domestic pigs: current knowledge and future research directions <https://doi.org/10.1136/vr.103593> *Vet Rec .* 2016 Mar 12;178(11):262-7.
23. Claudia Gabriel, Sandra Blome, Alexander Malogolovkin, Stanislav Parilov, Denis Kolbasov, Jens P. Teifke, Martin Beer Characterization of African Swine Fever Virus Caucasus Isolate in European Wild Boars *Emerg Infect Dis.* 2011 Dec; 17(12): 2342–2345. doi:[10.3201/eid1712.110430](#)
24. Dixon LK, Chapman DAG, Netherton CL, et al. African swine fever virus replication and genomics. *Virus Res.* 2013;173:3–14.
25. Donald P King, Scott M Reid, Geoffrey H Hutchings, Sylvia S Grierson, Philip J Wilkinson, Linda K Dixon, Armanda D S Bastos, Trevor W Drew: Development of a TaqMan PCR assay with internal amplification control for the detection of African swine fever virus *J Virol Methods .* 2003 Jan;107(1):53-61. doi: 10.1016/s0166-0934(02)00189-1
26. Efficiency at manufactures recommended concentration of 0,25% Against African Swine Fever Virus Performed by THE EUROPEAN UNION REFERENCE LABORATORY FOR AFRICAN SWINE FEVER (URL) URL For ASF, Centro de Investigación en Sanidad Animal CISA-INIA, Valdeolmos 28130, Madrid, Spain. E-mail: arias@inia.es; gallardo@inia.es; rnieto@inia.e <https://www.biosicurezzaweb.net/wp-content/uploads/2019/01/REPORT-2-VIROCID-URL-CISA-INIA-ASF.pdf>
27. EFSA (European Food Safety Authority), Anette, B, Anette, B, Theodora, CV, Klaus, D, Daniel, D, Vittorio, G, Georgina, H, Daniela, K, Annick, L, Aleksandra, M, Simon, M, Edvins, O, Sasa, O, Helen, R, Mihaela, S, Karl, S, Hans-Hermann, T, Grigaliuniene, V, Arvo, V, Richard, W, Grzegorz, W, José, AC, Sofie, D, Andrey, G, Corina, I, Alexandra, P, González, VLC and Christian, GS, 2020. Scientific report on the epidemiological analyses of African swine fever in the European Union (November 2018 to October 2019). *EFSA Journal* 2020;18(1):5996, 107 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.5996>

28. EFSA (European Food Safety Authority), Baños, JV, Boklund, A, Gogin, A, Gortázar, C, Guberti, V, Helyes, G, Kantere, M, Korytarova, D, Linden, A, Masiulis, M, Miteva, A, Neghirla, I, Ojševskis, E, Ostojic, S, Petr, S, Staubach, C, Thulke, H-H, Viltrop, A, Wozniakowski, G, Broglia, A, Abrahantes Cortiñas, J, Dhollander, S, Mur, L, Papanikolaou, A, Van der Stede, Y, Zancanaro, G and Ståhl, K, 2022. Scientific report on the epidemiological analyses of African swine fever in the European Union. *EFSA Journal* 2022; 20(5):7290, 106 pp.
<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7290>
29. EFSA (European Food Safety Authority), Boklund, A, Cay, B, Depner, K, Földi, Z, Guberti, V, Masiulis, M, Miteva, A, More, S, Olsevskis, E, Šatrán, P, Spiridon, M, Stahl, K, Thulke, H-H, Viltrop, A, Wozniakowski, G, Broglia, A, Cortinas Abrahantes, J, Dhollander, S, Gogin, A, Verdonck, F, Amato, L, Papanikolaou, A and Gortázar, C, 2018. Scientific report on the epidemiological analyses of African swine fever in the European Union (November 2017 until November 2018). *EFSA Journal* 2018;16(11):5494, 106 pp.
<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5494>
30. EFSA AHAW Panel (EFSA Panel on Animal Health and Welfare), More, S, Miranda, MA, Bicout, D, Bøtner, A, Butterworth, A, Calistri, P, Edwards, S, Garin-Bastuji, B, Good, M, Michel, V, Raj, M, Saxmose Nielsen, S, Sihvonen, L, Spoolder, H, Stegeman, JA, Velarde, A, Willeberg, P, Winckler, C, Depner, K, Guberti, V, Masiulis, M, Olsevskis, E, Satran, P, Spiridon, M, Thulke, H-H, Vilrop, A, Wozniakowski, G, Bau, A, Broglia, A, Cortiñas Abrahantes, J, Dhollander, S, Gogin, A, Muñoz Gajardo, I, Verdonck, F, Amato, L and Gortázar Schmidt, C, 2018. Scientific Opinion on the African swine fever in wild boar. *EFSA Journal* 2018;16(7):5344, 78 pp.
<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5344>
31. EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW) European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy, Scientific Opinion on African swine fever, This scientific opinion, published on 4 July 2014, replaces the earlier version published on 7 April 2014, *EFSA Journal* 2014;12(4):3628
<https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.2903/j.efsa.2014.3628>
32. EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW); Nielsen SS, Alvarez J, Bicout DJ, Calistri P, Canali E, Drewe JA, Garin-Bastuji B, Gonzales Rojas JL, Gortázar Schmidt C, Herskin M, Miranda Chueca MÁ, Michel V, Padalino B, Pasquali P, Sihvonen LH, Spoolder H, Stahl K, Velarde A, Viltrop A, Winckler C, Boklund A, Botner A, Gervelmeyer A, Mosbach-Schulz O, Roberts HC. Ability of different matrices to transmit African swine fever virus. *EFSA J.* 2021 Apr 27;19(4):e06558. doi: 10.2903/j.efsa.2021.6558. DOI: [10.2903/j.efsa.2021.6558](https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6558)
33. Encheng Sun, Lianyu Huang, Xianfeng Zhang, Jiwen Zhang, Dongdong Shen, Zhenjiang Zhang, Zilong Wang, Hong Huo, Wenqing Wang, Haoyue Huangfu, Wan Wang, Fang Li, Renqiang Liu, Jianhong Sun, Zhijun Tian, Wei Xia, Yuntao Guan, Xijun He, Yuanmao Zhu, Dongming Zhao, Zhigao Bu Genotype I African swine fever viruses emerged in domestic pigs in China and caused chronic infection, *Emerg Microbes Infect.* 2021 Dec;10(1):2183-2193. doi: 10.1080/22221751.2021.1999779. Pages 2183-2193
34. Erika Chenais, Karl Ståhl, Vittorio Guberti, Klaus Depner Identification of Wild Boar-Habitat Epidemiologic Cycle in African Swine Fever *Emerg Infect Dis.* 2018 Apr;24(4):810-812. doi: 10.3201/eid2404.172127.
35. European Food Safety Authority (EFSA), Andrea Gervelmeyer, Public consultation on the draft data section on the ability of ASFV to survive and remain viable in different matrices of the Scientific opinion on Risk assessment of African swine fever and the ability of products or materials to present a risk to transmit ASF virus, Technical report approved: 05 March 2021, <https://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/2021-04/9993.pdf>
36. European Food Safety Authority (EFSA), Desmecht, D, Gerbier, G, Gortázar Schmidt, C, Grigaliuniene, V, Helyes, G, Kantere, M, Korytarova, D, Linden, A, Miteva, A, Neghirla, I, Olsevskis, E, Ostojic, S, Petit, T, Staubach, C, Thulke, H-H, Viltrop, A, Richard, W, Wozniakowski, G, Abrahantes Cortiñas, J, Broglia, A, Dhollander, S, Lima, E, Papanikolaou, A, Van der Stede, Y and Ståhl, K, 2021. Scientific Opinion on the epidemiological analysis of

- African swine fever in the European Union (September 2019 to August 2020). *EFSA Journal* 2021;19(5):6572, 101 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6572>
37. European Union Reference Laboratory For African Swine Fever (EURL-ASF). CENTRO DE INVESTIGACION EN SANIDAD ANIMAL (INIA-CISA/CSIC) https://asf-referencelab.info/asf/images/GUIDELINES_DIAGNOSIS/Link_1_sampling_collection.pdf
Techniques and sampling collection for ASF diagnosis
 38. European Union Reference Laboratory For African Swine Fever (EURL-ASF). CENTRO DE INVESTIGACION EN SANIDAD ANIMAL (INIA-CISA/CSIC) HOW DOES ASF LOOK LIKE? https://asf-referencelab.info/asf/images/ficherosasf/video/PICTURES_CLINICAL_SIGNS_LESIONS.pdf
 39. Fernández-Pinero J, Gallardo C, Elizalde M, Robles A, Gómez C, Bishop R, Heath L, Couacy-Hymann E, Fasina FO, Pelayo V, Soler A, Arias M. Molecular diagnosis of African Swine Fever by a new real-time PCR using universal probe library. *Transbound Emerg Dis.* 2013 Feb;60(1):48-58. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22394449>
 40. Francisco J Salguero, Comparative Pathology and Pathogenesis of African Swine Fever Infection in Swine *Front Vet Sci* . 2020 May 19;7:282. DOI: [10.3389/fvets.2020.00282](https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00282)
 41. Friedrichs V, Reicks D, Hasenfuß T, Gerstenkorn E, Zimmerman JJ, Nelson EA, Carrau T, Deutschmann P, Sehl-Ewert J, Roszyk H, Beer M, Christopher-Hennings J, Blome S. Artificial Insemination as an Alternative Transmission Route for African Swine Fever Virus. *Pathogens.* 2022 Dec 14;11(12):1539. DOI: [10.3390/pathogens11121539](https://doi.org/10.3390/pathogens11121539)
 42. G S Colgrove, E O Haelterman, L Coggins Pathogenesis of African swine fever in young pigs *Am J Vet Res* . 1969 Aug;30(8):1343-59. PMID: 4894999
 43. Gabriel C, Blome S, Malogolovkin A, Parilov S, Kolbasov D, Teifke JP, Beer M: Characterization of African swine fever virus Caucasus isolate in European wild boars. *Emerg Infect Dis.* 2011, 17: 2342-2345. DOI: [10.3201/eid1712.110430](https://doi.org/10.3201/eid1712.110430).)
 44. Gallardo C, Fernández-Pinero J, Arias M. [African swine fever \(ASF\) diagnosis, an essential tool in the epidemiological investigation.](#) *Virus Res.* 2019 Oct 2;271:197676. doi: 10.1016/j.virusres.2019.197676.
 45. Gallardo C, Fernández-Pinero J, Pelayo V, Gazeaev I, Markowska-Daniel I, Pridotkas G, Nieto R, Fernández-Pacheco P, Bokhan S, Nevolko O, Drozhzhe Z, Pérez C, Soler A, Kolvasov D, Arias M (2014) Genetic variation among African swine fever genotype II viruses, eastern and central Europe. *Emerg Infect Dis* 20:1544–1547. <https://doi.org/10.3201/eid2009.140554>
 46. Gallardo Carmina, Casado Nadia, Soler Alejandro, Djadjovski Igor, Krivko Laura, Madueño Encarnación, Nieto Raquel, Perez Covadonga, Simon Alicia, Ivanova Emiliya, Donescu Daniel, Milicevik Vesna, Chondrokouki Eleni, Nurmoja Imbi, Frant Maciej, Feliziani Francesco, Václavek Petr, Pileviciene Simona, Marisa Arias A multi gene-approach genotyping method identifies 24 genetic clusters within the genotype II-European African swine fever viruses circulating from 2007 to 2022 *Front Vet Sci* 10. (2023) DOI: [10.3389/fvets.2023.1112850](https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1112850)
 47. Gallardo, C., Nieto, R., Soler, A., Pelayo, V., Fernández-Pinero, J., Markowska-Daniel, I., Pridotkas, G., Nurmoja, I., Granta, R., Simón, A., Pérez, C., Martín, E., Fernández-Pacheco, P., Arias, M., 2015a. Assessment of African swine fever diagnostic techniques as a response to the epidemic outbreaks in Eastern European Union countries: how to improve surveillance and control programs. *J. Clin. Microbiol.* 53 (8), 2555–2565 2015 Aug.
 48. Gaudreault NN, Madden DW, Wilson WC, Trujillo JD, Richt JA. [African Swine Fever Virus: An Emerging DNA Arbovirus.](#) *Front Vet Sci.* 2020 May 13;7:215. doi: 10.3389/fvets.2020.00215.
 49. Gogin A, Gerasimov V, Malogolovkin A, Kolbasov D. [African swine fever in the North Caucasus region and the Russian Federation in years 2007-2012.](#) *Virus Res.* 2013 Apr;173(1):198-203. doi: 10.1016/j.virusres.2012.12.007.
 50. Gómez-Villamandos JC, Bautista MJ, Sánchez-Cordón PJ, Carrasco L. Pathology of African swine fever: the role of monocyte-macrophage. *Virus Res.* 2013 Apr;173(1):140-9. doi: 10.1016/j.virusres.2013.01.017.

51. Gómez-Villamandos JC, Hervás JM, Endez A, Carrasco L, Martín de las Mulas J et al. (1995a) Experimental African swine fever: apoptosis of lymphocytes and virus replication in other cells. *Journal of General Virology*, 76, 2399-2405.
52. Guberti V, Khomenko S, Masiulis M and Kerba S, 2018. Handbook on African swine fever in wild boar and biosecurity during hunting. Standing Group of Experts on African swine fever in Europe under the GF-TADs umbrella. OIE, 2018. Available online: <https://oiebulletin.com/?official=2019-1-asf-wildboar-en>
53. Guinat C, Reis AL, Netherton CL, Goatley L, Pfeiffer DU, Dixon L. Dynamics of African swine fever virus shedding and excretion in domestic pigs infected by intramuscular inoculation and contact transmission. *Vet Res*. 2014 Sep 26;45(1):93. doi: [10.1186/s13567-014-0093-8](https://doi.org/10.1186/s13567-014-0093-8)
54. Haines FJ, Hofmann MA, King DP, Drew TW, Crooke HR. Development and validation of a multiplex, real-time RT PCR assay for the simultaneous detection of classical and African swine fever viruses. *PLoS One*. 2013 Jul 26;8(7):e71019. DOI: [10.1371/journal.pone.0071019](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071019)
55. Hakizimana, J.N., Yona, C., Makange, M.R. et al. Complete genome analysis of African swine fever virus genotypes II, IX and XV from domestic pigs in Tanzania. *Sci Rep* 13, 5318 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-32625-1>
56. Helena C de Carvalho Ferreira, Sara Tudela Zúquete, Michiel Wijnveld, Eefke Weesendorp, Frans Jongejan, Arjan Stegeman, Willie L A Loeffen: No evidence of African swine fever virus replication in hard ticks, *Ticks Tick Borne Dis*. 2014 Sep;5(5):582-9., DOI: [10.1016/j.ttbdis.2013.12.012](https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2013.12.012)
57. ID Screen® African Swine Fever Indirect Confirmation test, ASFB ver 0414 GB, **Innovative Diagnostics** www.id-vet.com, <https://www.innovative-diagnostics.com/produit/id-screen-african-swine-fever-indirect/>
58. Ingezim PPA Compac K3 ELISA test (Ingenasa) Ed.301018 INMUNOLOGÍA Y GENÉTICA APLICADA, SA – Avda. Constitución de enseñanza libre, 39 – 28037 MADRID (SPAIN), www.ingenasa.com, <http://staging.eurofins-technologies.com/media/4965/ft-ei-11ppak3-technical-sheet-ppa-compac.pdf>
59. J Moulton, L Coggins: Comparison of lesions in acute and chronic African swine fever, *Cornell Vet*. 1968 Jul;58(3):364-88.,
60. J. Carlson, L. Zani, T. Schwaiger, I. Nurmoja, A. Viltrop, A. Vilem, M. Beer, S. Blome: Simplifying sampling for African swine fever surveillance: Assessment of antibody and pathogen detection from blood swabs *Transbound Emerg Dis* . 2018 Feb;65(1):e165-e172. <https://doi.org/10.1111/tbed.12706>
61. J. M. Sánchez-Vizcaíno, L. Mur, J. C. Gomez-Villamandos and L. Carrasco, An Update on the Epidemiology and Pathology of African Swine Fever. *Comp. Path.* 2015, Vol. 152, 9-21
62. J.W. McVicar Quantitative aspects of the transmission of African swine fever *American Journal of Veterinary Research*, 45 (1984), pp. 1535-1541
63. Kalhari Bandara Goonewardene, Chukwunonso Onyilagha, Melissa Goolia, Van Phan Le, Sandra Blome, Aruna Ambagala, Superficial Inguinal Lymph Nodes for Screening Dead Pigs for African Swine Fever Viruses 2022, 14, 83. <https://doi.org/10.3390/v14010083>
64. Karl Ståhl, Susanna Sternberg-Lewerin, Sandra Blome, Arvo Viltrop, Mary-Louise Penrith, Erika Chenais Lack of evidence for long term carriers of African swine fever virus - a systematic review *Virus Res* . 2019 Oct 15;272:197725. DOI: [10.1016/j.virusres.2019.197725](https://doi.org/10.1016/j.virusres.2019.197725)
65. Laboratory biosafety manual, fourth edition. Geneva: World Health Organization; 2020 (Laboratory biosafety manual, fourth edition and associated monographs). Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
66. Li X, Li Y, Fan M, Fan S, Gao W, Ren J, Liu Q, Li J, Wu W, Li J, Yu Q, Wang X, Yan Z (2022) Inguinal lymph node sample collected by minimally invasive sampler helps to accurately diagnose ASF in dead pigs without necropsy. *Front. Vet. Sci*. 9:1000969. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.1000969>

67. Liu S, Luo Y, Wang Y, Li S, Zhao Z, Bi Y, Sun J, Peng R, Song H, Zhu D, Sun Y, Li S, Zhang L, Wang W, Sun Y, Qi J, Yan J, Shi Y, Zhang X, Wang P, Qiu HJ, Gao GF. Cryo-EM Structure of the African Swine Fever Virus. *Cell Host Microbe*. 2019 Dec 11;26(6):836-843.e3. DOI: [10.1016/j.chom.2019.11.004](https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.11.004)
68. Lohse L, Nielsen J, Uttenthal Å, Olesen AS, Strandbygaard B, Rasmussen TB, Belsham GJ, Bøtner A. Experimental Infections of Pigs with African Swine Fever Virus (Genotype II); Studies in Young Animals and Pregnant Sows. *Viruses*. 2022 Jun 25;14(7):1387.. DOI: [10.3390/v14071387](https://doi.org/10.3390/v14071387)
69. M Gonzague, F Roger, A Bastos, C Burger, T Randriamparany, S Smondack, C Cruciere Isolation of a non-haemadsorbing, non-cytopathic strain of African swine fever virus in Madagascar *Epidemiol Infect* . 2001 Jun;126(3):453-9. DOI: [10.1017/s0950268801005465](https://doi.org/10.1017/s0950268801005465)
70. Malogolovkin A, Burmakina G, Tulman ER, Delhon G, Diel DG, Salnikov N, Kutish GF, Kolbasov D, Rock DL (2015) African swine fever virus CD2v and C-type lectin gene loci mediate serological specificity. *J Gen Virol* 96:866–873. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000024>
71. Malogolovkin A, Kolbasov D (2019) Genetic and antigenic diversity of African swine fever virus. *Virus Res* 271:197673. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2019.197673>
72. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, twelfth edition 2023, Chapter 1.1.4. Chapter 1.1.4 Biosafety and biosecurity: Standard for managing biological risk in the veterinary laboratory and animal facilities. www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/1.01.04_BIOSAFETY_BIOSECURITY.pdf
73. Marie-Eve Schoder, Marylène Tignon, Annick Linden, Muriel Vervaeke, Ann Brigitte Cay, Evaluation of seven commercial African swine fever virus detection kits and three Taq polymerases on 300 well-characterized field samples, *Journal of Virological Methods*, Volume 280, 2020, 113874, <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2020.113874>. (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166093420301269>)
74. Michaud V, Randriamparany T, Albina E (2013) Comprehensive Phylogenetic Reconstructions of African Swine Fever Virus: Proposal for a New Classification and Molecular Dating of the Virus. *PLoS ONE* 8(7): e69662. doi:10.1371/journal.pone.0069662
75. Montgomery, R. E. (1921). On a form of swine fever occurring in British East Africa (Kenya Colony). *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics*, 34, 159– 191, 243–262. [https://doi.org/10.1016/S0368-1742\(21\)80031-4](https://doi.org/10.1016/S0368-1742(21)80031-4)
76. Mur, L., Atzeni, M., Martínez-López, B., Feliziani, F., Rolesu, S., & Sanchez-Vizcaino, J. M. (2014). Thirty-Five-Year Presence of African Swine Fever in Sardinia: History, Evolution and Risk Factors for Disease Maintenance. *Transboundary and Emerging Diseases*, 63(2), e165–e177. doi:10.1111/tbed.12264 <https://sci-hub.se/https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/tbed.12264>
77. NÉBIH: Afrikai sertéspestis gyűjtőoldal [ASP előfordulások/esetek 2018-2022 letölthető táblázat](https://portal.nebih.gov.hu/afrikai-sertespestis), <https://portal.nebih.gov.hu/afrikai-sertespestis>
78. NÉBIH: Afrikai sertéspestis gyűjtőoldal, https://portal.nebih.gov.hu/documents/10182/1215698/ASP_mintaazonos%C3%ADt%C3%B3+lap_2019-02_szigoru+sorszamos.pdf/dcf5e574-42e7-9b26-e1ec-8a360f09085d?t=1564686303417
79. Niederwerder MC, Stoian A, Rowland R, Dritz SS, Petrovan V, Constance LA, et al. Infectious Dose of African Swine Fever Virus When Consumed Naturally in Liquid or Feed. *Emerg Infect Dis*. 2019;25(5):891-897. <https://doi.org/10.3201/eid2505.181495>
80. Nix, R., Gallardo, C., Hutchings, G. et al. Molecular epidemiology of African swine fever virus studied by analysis of four variable genome regions. *Arch Virol* 151, 2475–2494 (2006). <https://doi.org/10.1007/s00705-006-0794-z>
81. Njau, E.P., Domelevo Entfellner, JB., Machuka, E.M. et al. The first genotype II African swine fever virus isolated in Africa provides insight into the current Eurasian pandemic. *Sci Rep* 11, 13081 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-92593-2>

82. Nurmoja I, Mõtus K, Kristian M, Niine T, Schulz K, Depner K, Viltrop A. Epidemiological analysis of the 2015-2017 African swine fever outbreaks in Estonia. *Prev Vet Med.* 2020 Aug;181:104556. doi: 10.1016/j.prevetmed.2018.10.001. doi:[10.1016/j.prevetmed.2018.10.001](https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2018.10.001)
83. OIE African swine fever (Technical disease card) 2021. <https://www.oie.int/en/what-we-do/animal-health-and-welfare/animal-diseases/technical-disease-cards>
84. Olesen, A.S.; Lohse, L.; Boklund, A.; Halasa, T.; Belsham, G.J.; Rasmussen, T.B.; Bøtner, A. Short time window for transmissibility of African swine fever virus from a contaminated environment. *Transbound. Emerg. Dis.* 2018, 65, 1024–1032 <https://doi.org/10.1111/tbed.12837>
85. Olesen, A.S.; Lohse, L.; Boklund, A.; Halasa, T.; Gallardo, C.; Pejsak, Z.; Belsham, G.J.; Rasmussen, T.B.; Bøtner, A. Transmission of African swine fever virus from infected pigs by direct contact and aerosol routes. *Vet. Microbiol.* 2017, 211, 92–102.
86. Országos afrikai sertéspestis készenléti terv <https://portal.nebih.gov.hu/documents/10182/525547297/Afrikai+sert%C3%A9spestis+k%C3%A9szenl%C3%A9ti+terv+2022.pdf/8f50ffb6-702e-6c3f-60fa-eff988e8eb54?t=1690296316162>
87. P S Mellor, R P Kitching, P J Wilkinson Mechanical transmission of capripox virus and African swine fever virus by *Stomoxys calcitrans* *Res Vet Sci.* 1987 Jul;43(1):109-12.
88. Pan IC, Hess WR. [Virulence in African swine fever: its measurement and implications.](#) *Am J Vet Res.* 1984 Feb;45(2):361-6. PMID: 6711963
89. Penrith ML, Vosloo W, Jori F, Bastos AD. [African swine fever virus eradication in Africa.](#) *Virus Res.* 2013 Apr;173(1):228-46. doi: 10.1016/j.virusres.2012.10.011.
90. Petrov A, Forth JH, Zani L, Beer M, Blome S. [No evidence for long-term carrier status of pigs after African swine fever virus infection.](#) *Transbound Emerg Dis.* 2018 Oct;65(5):1318-1328. doi: 10.1111/tbed.12881. Epub 2018 Apr 20. PMID: 29679458
91. Petrov A, Schotte U, Pietschmann J, Dräger C, Beer M, Anheyer-Behmenburg H, Goller KV, Blome S. Alternative sampling strategies for passive classical and African swine fever surveillance in wild boar *Vet Microbiol.* 2014 Oct 10;173(3-4):360-5. doi: 10.1016/j.vetmic.2014.07.030.
92. Pikalo J, Carrau T, Deutschmann P, Fischer M, Schlottau K, Beer M, Blome S. Performance Characteristics of Real-Time PCRs for African Swine Fever Virus Genome Detection-Comparison of Twelve Kits to an OIE-Recommended Method. *Viruses.* 2022 Jan 24;14(2):220. DOI: [10.3390/v14020220](https://doi.org/10.3390/v14020220)
93. Quembo CJ, Jori F, Vosloo W, Heath L. [Genetic characterization of African swine fever virus isolates from soft ticks at the wildlife/domestic interface in Mozambique and identification of a novel genotype.](#) *Transbound Emerg Dis.* 2018 Apr;65(2):420-431. doi: 10.1111/tbed.12700.
94. Randriamparany T, Kouakou KV, Michaud V, Fernández-Pinero J, Gallardo C, Le Potier MF, Rabenarivahiny R, Couacy-Hymann E, Raherimandimby M, Albina E.: [African Swine Fever Diagnosis Adapted to Tropical Conditions by the Use of Dried-blood Filter Papers.](#) *Transbound Emerg Dis.* 2016 Aug;63(4):379-88. doi: 10.1111/tbed.12295.
95. Rowlands RJ, Michaud V, Heath L, Hutchings G, Oura C, Vosloo W, Dwarka R, Onashvili T, Albina E, Dixon LK (2008) African swine fever virus isolate, Georgia, 2007. *Emerg Infect Dis* 14:1870–1874. <https://doi.org/10.3201/eid1412.080591>
96. Sánchez-Vizcaíno JM, Arias M (2012) African swine fever. In: *Diseases of Swine*, 10th Edit., JJ Zimmerman, L Karriker, A Ramirez, K Schwartz, G Stevenson, Eds., John Wiley & Sons, Ames, pp. 396e404.
97. Sastre P, Gallardo C, Monedero A, Ruiz T, Arias M, Sanz A, Rueda P. : Development of a novel lateral flow assay for detection of African swine fever in blood. *BMC Vet Res.* 2016 Sep 15;12:206. doi: 10.1186/s12917-016-0831-4.
98. Schlafer DH, McVicar JW, Mebus CA. African swine fever convalescent sows: subsequent pregnancy and the effect of colostral antibody on challenge

- inoculation of their pigs. *Am J Vet Res.* 1984 Jul;45(7):1361-6.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24049898/>
99. Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L., Johne, R., PCR inhibitors – occurrence, properties and removal, *Journal of Applied Microbiology*, Volume 113, Issue 5, 1 November 2012, Pages 1014–1026, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x>
 100. Thanh THT, Duc TA, Viet LD, Van HT, Thi NC, Thi CN, Thi NH, Vu DH (2021) Rapid identification for serotyping of African swine fever virus based on the short fragment of the EP402R gene encoding for CD2-like protein. *Acta Vet* 71:98–106. <https://doi.org/10.2478/acve-2021-0007>
 101. Thomson GR. [The epidemiology of African swine fever: the role of free-living hosts in Africa.](#) Onderstepoort J Vet Res. 1985 Sep;52(3):201-9.
 102. Tignon M, Gallardo C, Iscaro C, Hutet E, Van der Stede Y, Kolbasov D, De Mia GM, Le Potier MF, Bishop RP, Arias M, Koenen F. Development and inter-laboratory validation study of an improved new real-time PCR assay with internal control for detection and laboratory diagnosis of African swine fever virus. *J Virol Methods.* 2011 Dec;178(1-2):161-70.,DOI: [10.1016/j.jviromet.2011.09.007](https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.09.007)
 103. Virotype ASFV 2.0 PCR Kit Handbook for detection of DNA from African swine fever virus (ASFV), INDICAL BIOSCIENCE, GmbH, cat. no.: VT 28 1925, 01/2020
 104. Wales AD, Davies RH. Disinfection to control African swine fever virus: a UK perspective. *J Med Microbiol.* 2021 Sep;70(9):001410. doi: 10.1099/jmm.0.001410. PMID: 34477547; PMCID: PMC8697514. doi: [10.1099/jmm.0.001410](https://doi.org/10.1099/jmm.0.001410)
 105. Wang WH, Lin CY, Chang Ishcol MR, Urbina AN, Assavalapsakul W, Thithanyanont A, Lu PL, Chen YH, Wang SF. Detection of African swine fever virus in pork products brought to Taiwan by travellers. *Emerg Microbes Infect.* 2019;8(1):1000-1002. doi:[10.1080/22221751.2019.1636615](https://doi.org/10.1080/22221751.2019.1636615)
 106. Wang Y, Kang W, Yang W, Zhang J, Li D, Zheng H [Structure of African Swine Fever Virus and Associated Molecular Mechanisms Underlying Infection and Immunosuppression: A Review.](#) . *Front Immunol.* 2021 Sep 6;12:715582. doi: 10.3389/fimmu.2021.715582.
 107. Weiyun Qin, Zhongcheng Gao, Shenglong Wu & Wenbin Bao, Preliminary analysis of whether mosquitoes can carry and transmit African swine fever [BMC Veterinary Research](#) volume 17, Article number: 152 (2021)
 108. Wilkinson P.J. The Persistence Of African Swine Fever In Africa And The Mediterranean. *Preventive Veterinary Medicine*, 2 (1984) 71--82 71
 109. World Organisation for Animal Health (WOAH) Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2021 Chapter 3.9.1 African Swine Fever https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.08.01_ASF.pdf
 110. Yong Zhang, Qinghua Wang, Zhongyi Zhu, Shujuan Wang, Shuyang Tu, Yongqiang Zhang, Yanli Zou, Yutian Liu, Chunju Liu, Weijie Ren, Dongxia Zheng, and Yunling Zhao et al. *Transboundary and Emerging Diseases* Volume 2023, Article ID 4820809, 14 pages <https://doi.org/10.1155/2023/4820809> Tracing the Origin of Genotype II African Swine Fever Virus in China by Genomic Epidemiology Analysis
 111. Zani L, Forth JH, Forth L, Nurmoja I, Leidenberger S, Henke J, Carlson J, Breidenstein C, Viltrop A, Höper D, Sauter-Louis C, Beer M, Blome S. Deletion at the 5'-end of Estonian ASFV strains associated with an attenuated phenotype. *Sci Rep.* 2018 Apr 25;8(1):6510. doi:10.1038/s41598-018-24740-1
 112. Zhang Hongliang, Zhao Saisai, Zhang Haojie, Qin Zhihua, Shan Hu, Cai Xiulei *Front. Microbiol.*, 27 April 2023 Sec. Infectious Agents and Disease Volume 14 2023 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1139494>