Rosnące znaczenie genomiki w rozpoznawaniu chorób zakaźnych zwierząt z uwzględnieniem potrzeb OIE

GRZEGORZ WOŹNIAKOWSKI, MARIAN TRUSZCZYŃSKI, ZYGMUNT PEJSAK

Zakład Chorób Świń, Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy w Puławach,
Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Otrzymano 04.10.2016

Zaakceptowano 10.11.2016

Woźniakowski G., Truszczyński M., Pejsak Z.

Increasing importance of genomics in recognition of infectious animal diseases taking into account OIE requirements

Summary

Currently, the diagnosis methods applied in bacteriology and virology are frequently focused at modern molecular methods such as polymerase chain reaction (PCR), real-time PCR, loop-mediated isothermal amplification (LAMP) or confirmatory methods for already identified infectious agents of animals such as high throughput sequencing – HTS, or next-generation sequencing (NGS). A number of these methods are officially recommended by the World Organisation for Animal Health (OIE) for the routine diagnosis of major animal diseases with the greatest economical impact. The aim of this paper is to provide to a reader an overview on recent genomic methods used in diagnosis of infectious animal diseases along with their advantages and limitations. These methods facilitate efficient and reliable identification of animal pathogens and allow to characterize and sometimes to identify a newly recognized species of bacteria and viruses.

Keywords: genomics, infectious animal diseases, diagnosis, PCR, LAMP, HTS, NGS

Od powstania w 1924 r. Światowej Organizacji Zdrowia Zwierząt (OIE) z siedzibą w Paryżu, wcześniej zwanej Urzędem do spraw Epizootii (Office International des Epizooties, OIE), dzięki realizowanym w jej ramach pracom nagromadził się znaczący potencjał metod diagnostycznych w odniesieniu do rozpoznawania chorób zakaźnych zwierząt, zwłaszcza chorób transgranicznych – o dużej szybkości szerzenia się w skali globalnej (38).

Aktualnie w celu rozpoznawania chorób zakaźnych zwierząt na świecie OIE dysponuje 252 laboratoriami referencyjnymi i 49 ośrodkami współpracującymi, w których zatrudniani są specjaliści z zakresu diagnostyki laboratoryjnej i epidemiologii chorób zakaźnych zwierząt oraz odzwierzęcych chorób człowieka. Są one zlokalizowane w licznych krajach członkowskich OIE. W Polsce, w Państwowym Instytucie Weterynaryjnym – Państwowym Instytucie Badawczym (PIWet-PIB) znajdują się następujące tego rodzaju laboratoria: klasycznego pomoru świń (CSF), zespołu rozrodczo-oddechowego świń (PRRS), enzootycznej białaczki bydła (EBL) oraz gorączki Q.

Ta olbrzymia baza badawcza umożliwia od lat gromadzenie w OIE dużej liczby danych o występujących na świecie chorobach zakaźnych zwierząt. Rozpoznania gromadzone są w Światowym Systemie

Informacji o Zdrowiu Zwierząt (World Animal Health Information System, WAHIS), który w OIE oparty jest na aplikacjach internetowych baz danych w aspekcie zbierania i upowszechniania informacji w skali światowej, a zwłaszcza w odniesieniu do obecnie 180 państw będących członkami OIE. Działania te uwzględniają, obok zwierząt udomowionych, takie same procedury w odniesieniu do zwierząt wolno żyjących, czyli dzikich, co określane jest jako WAHIS-Wild.

Do centrali OIE w Paryżu stale wpływają od państw członkowskich dane o sytuacji epidemiologicznej, w tym o rozpoznawaniu i występowaniu chorób zakaźnych, określanych jako „listed diseases”. Lista ta obejmuje obok chorób o mniejszej dynamice szerzenia się, przede wszystkim choroby zakaźne o dużej dynamice transgranicznego rozprzestrzeniania się w skali globalnej. Uzyskiwane informacje o eradykacji wchodzącej w grę choroby o szczególnym znaczeniu ekonomicznym stanowią też podstawę do uznawania kraju, regionu lub kompartmentu za od tego momentu wolny od tej choroby zakaźnej, co stanowi podstawę do wycofania zakazów eksportowych odnośnie do zwierząt, ich surowców i przetworzonych produktów.

Dzięki działalności szeregu komisji specjalistycznych OIE utworzone zostały wytyczne administracyjnego postępowania weterynaryjnego zwalczania

chorób zakaźnych, zwłaszcza w postaci stale doskonalonych kodeksów: Kodeksu Zdrowia Zwierząt Lądowych (Terrestrial Animal Health Code) i Kodeksu Zwierząt Wodnych (Aquatic Animal Health Code).

W nawiązaniu do rozpoznawania, w tym laboratoryjnego, chorób zakaźnych zwierząt lądowych znajduje się obecnie siódme wydanie z 2012 r. Manualu Testów Diagnostycznych i Szczepionek dla Zwierząt Lądowych (ssaków, ptaków i pszczoł) (Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, mammals, birds and bees) oraz analogiczne opracowanie zawierające testy diagnostyczne dla chorób zwierząt wodnych (38).

Zgodnie z danymi OIE, szereg testów diagnostycznych odnośnie do chorób zakaźnych zwierząt, opierających się na klasycznej mikrobiologii (w tym testy biochemiczne, identyfikacja serologiczna, określanie mian serologicznych, typowanie bakteriofagowe czy próby biologiczne na zwierzętach) oraz immunologię, zastępowanych jest, począwszy od minionych trzydziestu lat, przez nowe testy diagnostyczne, uwzględniające osiągnięcia genetyki. Przedmiotem niniejszego opracowania jest charakterystyka ważniejszych spośród nich. Omawiane techniki genetyczne, coraz częściej i szerzej zastępują testy opierające się na ocenie właściwościach fenotypowych drobnoustrojów i reakcjach antygen–przeciwciała (3, 6, 23, 24).

Dotychczas opracowano wiele technik wykrywania i analizy materiału genetycznego bakterii i wirusów, z których najbardziej istotnymi wydają się: łańcuchowa reakcja polimerazy (polymerase chain reaction – PCR) (25, 26, 36) wraz z jej pochodnymi modyfikacjami oraz techniki amplifikacji DNA w warunkach stałej temperatury (29, 40).

Zasadą działania PCR jest powielanie specyficznych fragmentów kwasów nukleinowych bakterii lub wirusów przy zastosowaniu termostabilnej polimerazy DNA izolowanej z termofilnej bakterii *Thermus aquaticus*. Poprzez naśladowanie procesu replikacji DNA w każdej żywej komórce po denaturacji podwójnej helisy DNA na 2 pojedyncze nici i dołączeniu krótkich, specyficznych do ich sekwencji starterów DNA dochodzi do syntezy potomnych nici w obu przeciwnych kierunkach. Technika wymaga zastosowania termocyklerów do PCR, zdolnych do szybkiej, cyklicznej zmiany temperatury oraz aparatów do rozdzielania uzyskanych produktów reakcji w żelu agarozowym lub poliakrylamidowym (26). Opracowanie PCR pozwoliło w 1990 r. na stworzenie procedury amplifikacji materiału genetycznego wirusa choroby Aujeszkiego (SHV-1) i zastąpienie stosowanej dotychczas techniki southern-blot (22). Podobnie Liu i wsp. (21) opracowali technikę PCR z etapem odwrotnej transkrypcji (reverse transcription – RT-PCR) do wykrywania RNA wirusa CSF. W tym samym czasie Sirois i wsp. (37) wdrożyli technikę PCR do szybkiej identyfikacji innego ważnego patogenu świń, którym jest *Actinobacillus*

pleuropneumoniae (APP), natomiast Harasawa i wsp. (16) jako pierwsi opisali zastosowanie tego samego testu do wykrywania DNA *Mycoplasma hyopneumoniae*. Wszystkie przedstawione pierwsze opracowania PCR wykazały wysoką przydatność tej metody w diagnostyce ważnych patogenów świń. Zastosowanie technik opartych na PCR czy PCR w czasie rzeczywistym (real-time PCR) pozwoliło na ulepszenie współczesnej diagnostyki takich chorób zakaźnych, jak: CSF, afrykański pomór świń (ASF), czy pryszczycza (FMD) (25, 35, 37).

Wprowadzenie real-time PCR do diagnostyki weterynaryjnej pozwoliło na wykrywanie materiału genetycznego wielu patogenów z ponad 10-100-krotnie wyższą czułością w stosunku do konwencjonalnej metody PCR. Co więcej, zastosowanie wielu specyficznych sond molekularnych w pojedynczej reakcji typu real-time PCR pozwoliło na jednoczesną identyfikację nawet 12 patogenów, włączając m.in.: ASFV, CSFV, FMDV, PRRSV czy cirkowirus świń typu 2 – PCV2 (35). Należy zwrócić uwagę, iż wiele z metod diagnostycznych zalecanych przez OIE opiera się na technice real-time PCR, która jest obecnie jedną z najbardziej wiarygodnych, czułych i specyficznych metod diagnostycznych (38).

Kolejnym krokiem w doskonaleniu diagnostyki chorób zakaźnych zwierząt przy wykorzystaniu genomiki było opracowanie szybkich testów amplifikacji w warunkach stałej temperatury, które do przeprowadzenia nie wymagają stosowania kosztownej aparatury laboratoryjnej, takiej jak termocyklery do PCR czy systemy do real-time PCR, a mogą przy tym zapewnić identyfikację czynników zakaźnych na wysokim poziomie specyficzności i czułości diagnostycznej. Metody te reprezentowane są przede wszystkim przez LAMP (loop-mediated isothermal amplification), czyli amplifikację w warunkach stałej temperatury (LAMP), których przewagą jest możliwość ich wykonania z użyciem prostego wyposażenia laboratoryjnego typu łaźnia wodna o stałej temperaturze około 60°C oraz lampy UV do odczytu fluorescencji w próbkach zawierających materiał genetyczny wykrywanego patogenu. Do przeprowadzenia metody LAMP nie jest zatem wymagane posiadanie kosztownego sprzętu laboratoryjnego w postaci termocyklerów do PCR czy systemów do real-time PCR (9, 11, 29). LAMP wykorzystuje inne niż w przypadku PCR polimerazy DNA, takie jak: Bst – izolowaną z bakterii *Bacillus stearothermophilus*, Bsm izolowaną z bakterii *Bacillus smithi* czy GspSSD pochodzącą z bakterii rodzaju *Geobacillus* sp., które mają zdolność do rozplatania podwójnej helisy DNA w warunkach stałej temperatury. Ponadto polimerazy te syntetyzują nowe nici DNA z 6 różnych starterów jednocześnie. Zapewnia to bardzo dużą szybkość działania LAMP. Do przeprowadzenia LAMP wymagana jest jedynie łaźnia wodna i lampa emitująca promieniowanie UV. W przypadku

występowania specyficznego dla danego patogenu DNA w próbkach zawierających mieszaninę reakcyjną z dodatkiem barwnika wiążącego dwuniciowe produkty, takiego jak SYBR Green® w świetle lampy UV po ok. 30 min. obserwowana jest zielonkawa fluorescencja. Z kolei w próbkach nie zawierających materiału genetycznego wirusa mieszanina reakcyjna nie wykazuje fluorescencji. Ponadto, LAMP nie wymaga rozdziału elektroforetycznego produktów w żelach agarozowych lub poliakrylamidowych, jak ma to miejsce w przypadku PCR. Dotychczas metodę tę opracowano m.in. do wykrywania DNA PCV2 (10), PRRSV (11), CSFV (9), ASFV (18) oraz wirusa grypy świń (swine influenza virus – SIV) (14).

Badania nad nowymi metodami z zakresu genomiki są obecnie również prowadzone w Krajowym Laboratorium Referencyjnym (KLR) ds. ASF w PIWet-PIB, gdzie opracowano technikę łańcuchowej reakcji amplifikacji spiralno-krzyżowej (polymerase cross-linking spiral reaction – PCLSR), która posiada wiele zalet w porównaniu do technik PCR czy real-time PCR (39). Ponadto zastosowanie unikalnego układu 3 starterów komplementarnych do wykrywanej sekwencji patogenu ogranicza możliwość uzyskania wyników fałszywie dodatnich, co w przypadku metod przeprowadzanych w stałych warunkach temperatury okazuje się bardzo ważne.

W celu potwierdzania zidentyfikowanych czynników chorób zakaźnych duże znaczenie ma doskonalenie metod diagnostycznych opierających się na określaniu sekwencji nukleotydowej kwasów nukleinowych – począwszy od wprowadzonej w latach 70. XX wieku techniki Sanger (33), aż po w pełni zautomatyzowane techniki sekwencjonowania kompletnych genomów wybranych patogenów, tj. High Throughput Sequencing (HTS) lub sekwencjonowania następnej generacji (next-generation sequencing – NGS). Przełom w stosowaniu techniki sekwencjonowania Sanger na rzecz sekwencjonowania następnej generacji (NGS) nastąpił w 2005 r., kiedy to NGS stała się techniką zalecaną przez OIE do identyfikacji wielu różnych gatunków bakterii i wirusów (24, 38). Stało się tak, ponieważ techniki te pozwalają na szczegółową charakterystykę molekularną drobnoustrojów oraz określenie ich unikalnych właściwości, takich jak patogenność, pochodzenie geograficzne, czy zmienność antygenowa. Zasada działania technik HTS czy NGS polega na sekwencjonowaniu wszystkich możliwych fragmentów kwasu nukleinowego zawartego w wyizolowanej próbce pobranej od podejrzanego o zakażenie zwierzęcia. Inaczej więc niż w przypadku sekwencjonowania techniką Sanger, w której oznaczana sekwencja jest ograniczona tylko do fragmentu o długości od 200-800 par zasad (pz), sekwencjonowaniu podlegają wszystkie zgromadzone w mieszaninie kwasów nukleinowych fragmenty DNA. Podczas NGS odczytywane są fragmenty o re-

latywnie krótkiej sekwencji o różnej długości od 75 pz do 700 pz, lecz liczba uzyskanych odczytów wynosi od 300 tys. do nawet 2 bln sekwencji. Pozwala to po obróbce komputerowej i połączeniu poszczególnych odczytów na uzyskanie dokładnych i wiarygodnych informacji genetycznej identyfikowanych patogenów, nawet tych dotychczas nie poznanych.

Należy wziąć pod uwagę, iż stosowane od 30 lat do chwili obecnej metody molekularnej analizy drobnoustrojów, zwłaszcza sekwencjonowanie produktów PCR wybranych fragmentów genomu, pozwalały jedynie na częściowe poznanie i zrozumienie zarówno zjawisk różnorodności genetycznej, jak również niektórych mechanizmów związanych z ich patogennością. Z tego powodu większość ze zgromadzonych w latach 90. XX w. oraz na początku XXI w. danych, dotyczących kompletnych genomów bakterii lub wirusów, pozostaje nadal w fazie wstępnej, gdyż konieczna jest ich weryfikacja przy użyciu wspomnianej wcześniej techniki HTS.

HTS jest również obecnie techniką szeroko używaną w wirusologii oraz wprowadzaną stopniowo w bakteriologii (34). W najbliższej przyszłości będzie, jak się zapowiada, rutynową metodą diagnostyczną w przypadku wybuchów chorób zakaźnych i przeglądach epidemiologicznych.

W pracy opublikowanej przez Mathijasa i wsp. (24) badano potencjalne możliwości zaawansowanych technik genetycznych do rozpoznawania chorób u zwierząt oraz w ocenie sytuacji epidemiologicznej.

Coraz łatwiejszy dostęp oraz malejące koszty zastosowania technik HTS czy NGS, przy użyciu których generowane są miliony odczytów sekwencji nukleotydowych powoduje jednocześnie, że wyciąganie wniosków z tak rozległych analiz wymaga dużej ostrożności oraz właściwej interpretacji wyników. Poszukiwanie pojedynczych mutacji nukleotydowych (single nucleotide polymorphisms – SNP) w wybranych genach lub całych genomach drobnoustrojów pozwala m.in. na ustalenie prawdopodobnych zależności filogenetycznych pomiędzy nimi oraz ich pochodzenia geograficznego.

Pomimo początkowych trudności w pozyskaniu materiału genetycznego wirusów o odpowiedniej koncentracji i jakości dotychczas udało się poznać kompletne sekwencje genomów ASFV (8), CSFV (24) wirusa grypy ptaków (avian influenza virus – AIV) (17), choroby niebieskiego języka (BTV) (30), FMDV (20, 41), PRRSV (5), grypy ptaków (AIV) (36), wirusa Ebola (EBV) oraz wirusa rzekomego pomoru drobiu (NDV) (2, 13, 14, 17, 32). Należy również zaznaczyć iż obecnie techniki HTS czy NGS są zalecane przez OIE do stosowania w dochodzeniu epizootycznym związanym z występowaniem wirusów grypy ptaków i świń.

W odniesieniu do najbardziej istotnych patogenów świń, takich jak FMDV przeprowadzone przez Wrighta i wsp. (41) badania wykazały dużą przydatność tech-

niki NGS do oceny zróżnicowania genetycznego tego wirusa w materiale zakaźnym pobranym od tego samego zwierzęcia. Opracowana przez Logana i wsp. (20) uniwersalna procedura sekwencjonowania kompletnych genomów FMDV należących do wszystkich 7 serotypów FMDV pozwoliła na uzyskanie szczegółowych informacji na temat zmienności genetycznej tego wirusa. Badania te pozwoliły na identyfikację pojedynczych polimorfizmów sekwencji genomu tego wirusa oraz ocenę częstości mutacji jego RNA jako $7,8 \times 10^{-4}$ na 1 nukleotyd. Uzyskane wyniki były zgodne z wcześniej opublikowanymi danymi przez Carrillo i wsp. (7) wskazujących na występowanie 1-5 substytucji nukleotydowych po przeprowadzeniu 1 pasażu FMDV z użyciem eksperymentalnego zakażenia świń oraz sekwencjonowania genomu FMDV tradycyjną metodą Sangera (33).

Technikę NGS zastosowano również do poznania sekwencji genomu szczepów wirusa CSF (CSFV) o zróżnicowanej patogenności (24). W badaniach tych wykazano, że wysoce patogenne izolaty CSFV, izolowane od zakażonych eksperymentalnie świń wykazują dużo wyższe, wewnątrzgatunkowe zróżnicowanie genetyczne w porównaniu do szczepów o niskiej lub umiarkowanej patogenności. Obserwowane mutacje zidentyfikowano w sekwencji kodującej białka E2 oraz NS5B, które biorą udział w adsorpcji oraz replikacji CSFV. Obserwowana zmienność genetyczna może być odpowiedzią na reakcję ze strony układu odpornościowego gospodarza i próbą dostosowania się (fitness) do otoczenia poprzez podwyższenie tempa replikacji wirusa w komórce. Późniejsze badania przeprowadzone przez Zhou i wsp. (43) wykazały wysokie podobieństwo sekwencji genomu szczepu LK-VNIVViM pochodzącego z Rosji i stosowanego w profilaktyce CSF do szczepu Rovac, będącego prawdopodobnie jego filogenetycznym prekursorem.

NGS jest również techniką stosowaną od 2011 r. w badaniach różnorodności genetycznej SIV (19) w tym pandemicznego wirusa grypy podtypu – H1N1. Należy wspomnieć, iż stosowana wcześniej technika Sangera pozwalała jedynie na częściową ocenę zróżnicowania genetycznego, jednakże nie uwzględniała możliwości występowania różnych wariantów wirusa w obrębie tego samego gatunku (quasispecies).

Z kolei w przypadku badań nad chorobami była istotnym postępowaniem było wprowadzenie HTS w celu scharakteryzowania i analizy filogenetycznego pochodzenia nowych wariantów BTV (4). Przy użyciu tej samej techniki stwierdzono po raz pierwszy nieznany dotąd wirus Schmallerberg (SBV) (1).

W przypadku ASFV zastosowanie techniki NGS pozwoliło na dokładną analizę sekwencji genomu szczepu delecyjnego ASFV-G-Δ9GL, pozbawionego genu 9GL związanego z patogennością wirusa. Zastosowana metoda pozwoliła na potwierdzenie wprowadzonych w obrębie genomu ASFV punktowych zmian gene-

tycznych, które warunkowały utracenie przez ten wirus właściwości patogennych dla eksperymentalnie zakażonych świń (28).

Ze względu na dużą przydatność technik opartych na HTS są one obecnie rekomendowane do identyfikacji patogenów przez OIE w badaniach z zakresu genomiki takich czynników etiologicznych jak AIV i FMDV. Nie bez znaczenia pozostaje również możliwość wykrywania tą techniką występowania mieszanych zakażeń różnymi patogenami w przebiegu wieloczynnikowych jednostek chorobowych.

Podsumowując wszystkie zalety nowo opracowanych i coraz częściej wdrażanych do rutynowej diagnostyki technik biologii molekularnej, włączając PCR, LAMP, HTS czy NGS, należy pamiętać o postulatach Roberta Kocha, które pomimo upływu ponad 120 lat, nadal stanowią główną podstawę wszelkich badań nad czynnikami etiologicznymi chorób zakaźnych (31). Wydaje się, że kluczowym etapem w opracowywaniu nowoczesnej diagnostyki laboratoryjnej, w tym weterynaryjnej było wynalezienie i wprowadzenie do powszechnego stosowania techniki PCR. Późniejsze przełomowe opracowania oparte były w dużej mierze na pierwotnych założeniach tej techniki, pozwalającej na stosunkowo proste powielanie, a następnie szczegółową analizę sekwencji nukleotydowej genów lub całych genomów bakterii i wirusów patogennych dla zwierząt i ludzi. Przedstawione w pracy alternatywne techniki biologii molekularnej, takie jak LAMP pozwalają na wykrywanie materiału genetycznego bakterii i wirusów w skromnych pod względem wyposażenia warunkach laboratoryjnych przy zachowaniu wysokiej czułości i specyficzności. Z kolei techniki oparte na real-time PCR wydają się testami, które w referencyjnych pod względem danej jednostki chorobowej laboratoriach badawczych mogą być stosowane jako wiarygodne i powtarzalne metody diagnostyczne o bardzo wysokiej czułości diagnostycznej. Z kolei użycie metod sekwencjonowania całych genomów bakteryjnych czy wirusowych przy użyciu technik HTS, czy NGS pozwala na zweryfikowanie zidentyfikowanych czynników zakaźnych oraz poznanie ich szczegółowych i unikalnych właściwości. Pewnym ograniczeniem w coraz to wydajniejszych metodach badawczych typu HTS i NGS może być ilość gromadzonych informacji w postaci cyfrowej, która do interpretacji wymaga sprawnych i wydajnych systemów komputerowych oraz odpowiednio przeszkolonego w tym zakresie personelu, tj. bioinformatyków.

Piśmiennictwo

1. Beer M., Conraths F. J., Van der Poel W. H.: 'Schmallenberg virus': a novel orthobunyavirus emerging in Europe. *Epidemiol. Infect.* 2013, 131, 1-8.
2. Beerenwinkel N.: Ultra-deep sequencing analysis of viral populations. *Curr. Opin. Virol.* 2011, 1, 413-418.
3. Belák S.: Molecular diagnosis of viral diseases, present trends and future aspects: a view from the OIE Collaborating Centre for the application of polymerase chain reaction methods for diagnosis of viral diseases in veterinary medicine. *Vaccine* 2007, 30, 5444-5452.

4. Boyle D. B., Bulach D. M., Amos-Ritchie R., Adams M. M., Walker P. J., Weir R.: Genomic sequences of Australian bluetongue virus prototype serotypes reveal global relationships and possible routes of entry into Australia. *J. Virol.* 2012, 86, 6724-6731.
5. Brar M. S., Shi M., Hui R. K., Leung F. C.: Genomic evolution of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) isolates revealed by deep sequencing. *PLoS One* 2014, 9, e88807.
6. Buchan B. W., Ledeboer N. A.: Emerging technologies for the clinical microbiology laboratory. *Clin. Microbiol. Rev.* 2014, 27, 783-822.
7. Carrillo C., Lu Z., Borca M. V., Vagnozzi A., Kutish G. F., Rock D. L.: Genetic and phenotypic variation of foot-and-mouth disease virus during serial passages in a natural host. *J. Virol.* 2007, 81, 11341-11351.
8. Chapman D. A., Darby A. C., Da Silva M., Upton C., Radford A. D., Dixon L. K.: Genomic analysis of highly virulent Georgia 2007/1 isolate of African swine fever virus. *Emerg. Infect. Dis.* 2011, 17, 599-605.
9. Chen H. T., Zhang J., Ma L. N., Ma Y. P., Ding Y. Z., Liu X. T., Chen L., Ma L. Q., Zhang Y. G., Liu Y. S.: Rapid pre-clinical detection of classical swine fever by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *Mol. Cell Probes.* 2009, 23, 71-74.
10. Chen H. T., Zhang J., Sun D. H., Chu Y. F., Cai X. P., Liu X. T., Luo X. N., Liu Q., Liu Y. S.: Rapid detection of porcine circovirus type 2 by loop-mediated isothermal amplification. *J. Virol. Methods* 2008, 149, 264-268.
11. Chen H. T., Zhang J., Sun D. H., Ma L. N., Liu X. T., Quan K., Liu Y. S.: Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for the detection of highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Virol. Methods* 2008, 153, 266-268.
12. Chen P. E., Shapiro B. J.: The advent of genome-wide association studies for bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 2015, 25, 17-24.
13. Coffey L. L., Page B. L., Greninger A. L., Herring B. L., Russel R. C., Doggett S. L., Haniotis J., Wang C., Deng X., Delwart, Fredricks D. N., Relman D. A.: Sequence-based identification of microbial pathogens: a reconsideration of Koch's postulates. *Clin. Microbiol. Rev.* 1996, 9, 18-33.
14. Gu H., Qi X., Li X., Jiang H., Wang Y., Liu F., Lu S., Yang Y., Liu F.: Rapid and specific detection of H3 swine influenza virus using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification method. *J. Appl. Microbiol.* 2010, 108, 1145-1154.
15. Hao W., Allen V. G., Jamieson F. B., Low D. E., Alexander D. C.: Phylogenetic incongruence in *E. coli* O104: understanding the evolutionary relationships of emerging pathogens in the face of homologous recombination. *PLoS One* 2012, 7, e33971.
16. Harasawa R., Koshimizu K., Takeda O., Uemori T., Asada K., Kato I.: Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* DNA by the polymerase chain reaction. *Mol. Cell Probes* 1991, 5, 103-109.
17. Hoper D., Hoffmann B., Beer M.: A comprehensive deep sequencing strategy for full-length genomes of influenza A. *PLoS One* 2011, 6, e19075.
18. James H. E., Ebert K., McGonigle R., Reid S. M., Boonham N., Tomlinson J. A., Hutchings G. H., Denyer M., Oura C. A., Dukes J. P., King D. P.: Detection of African swine fever virus by loop-mediated isothermal amplification. *J. Virol. Methods* 2010, 164, 68-74.
19. Kampmann M. L., Fordyce S. L., Avila-Arcos M. C., Rasmussen M., Willerslev E., Nielsen L. P., Gilbert M. T.: A simple method for the parallel deep sequencing of full influenza A genomes. *J. Virol. Methods* 2011, 178, 243-248.
20. Logan G., Freimanis G. L., King D. J., Valdazo-González B., Bachanek-Bankowska K., Sanderson N. D., Knowles N. J., King D. P., Cottam E. M.: A universal protocol to generate consensus level genome sequences for foot-and-mouth disease virus and other positive-sense polyadenylated RNA viruses using the Illumina MiSeq. *BMC Genomics* 2014, 30, 828.
21. Liu S. T., Li S. N., Wang D. C., Chang S. F., Chiang S. C., Ho W. C., Chang Y. S., Lai S. S.: Rapid detection of hog cholera virus in tissues by the polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods* 1991, 35, 227-236.
22. Maes R. K., Beisel C. E., Spatz S. J., Thacker B. J.: Polymerase chain reaction amplification of pseudorabies virus DNA from acutely and latently infected cells. *Vet. Microbiol.* 1990, 24, 281-295.
23. Maiden M. C., Jansen van Rensburg M. J., Bray J. E., Earle S. G., Ford S. A., Jolley K. A., McCarthy N. D.: MLST revisited: the gene-by-gene approach to bacterial genomics. *Nat. Rev. Microbiol.* 2013, 11, 728-736.
24. Mathijs E., Vandenbussche F., Van Borm S.: Using genomics for surveillance of veterinary infectious agents. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 2016, 35, 143-157.
25. McNally A.: Veterinary applications of real-time PCR for detection and diagnosis of infectious agents, [w:] Real-time PCR: advanced technologies and applications (M. A. Lee, N. A. Saunders, eds). Caister Academic Press, Norfolk 2015, 111-122.
26. Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., Erlich H.: Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 1986, 51, 263-273.
27. Network of Expertise on Animal Influenza (OFFLU). OFFLU strategy document for surveillance and monitoring of influenzas in animals. Dostęp pod adresem: www.offlu.net/fileadmin/home/en/publications/pdf/OFFLUsurveillance.pdf. (dostęp 25.08.2016).
28. O'Donnell V., Holinka L. G., Krug P. W., Gladue D. P., Carlson J., Sanford B., Alfano M., Kramer E., Lu Z., Arzt J., Reese B., Carrillo C., Risatti G. R., Borca M. V.: African Swine Fever Virus Georgia 2007 with a Deletion of Virulence-Associated Gene 9GL (B119L), when Administered at Low Doses, Leads to Virus Attenuation in Swine and Induces an Effective Protection against Homologous Challenge. *J. Virol.* 2015, 89, 8556-8566.
29. Parida M., Posadas G., Inoue S., Hasebe F., Morita K.: Real-Time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of West Nile Virus. *J. Clin. Microbiol.* 2004, 42, 257-263.
30. Rao P. P., Reddy Y. N., Ganesh K., Nair S. G., Niranjana V., Hegde N. R.: Deep sequencing as a method of typing bluetongue virus isolates. *J. Virol. Meth.* 2013, 193, 314-319.
31. Rivers T. M.: Viruses and Koch's postulates. *J. Bacteriol.* 1937, 33, 1-12.
32. Sachsenröder J. T. S., Hammerl J. A., Janczyk P., Wrede P., Hertwig S., John R.: Simultaneous identification of DNA and RNA viruses present in pig faeces using process-controlled deep sequencing. *PLoS One*, 2012, 7, e34631.
33. Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R.: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1977, 74, 5463-5467.
34. Schadt E. E., Turner S., Kasarskis A.: A window into third-generation sequencing. *Hum. Molec. Genet.* 2010, 19, 227-240.
35. Shi X., Liu X., Wang Q., Das A., Ma G., Xu L., Sun Q., Peddireddi L., Jia W., Liu Y., Anderson G., Bai J., Shi J.: A multiplex real-time PCR panel assay for simultaneous detection and differentiation of 12 common swine viruses. *J. Virol. Methods* 2016, 236, 258-265.
36. Slomka M. J., Densham A. L., Coward V. J., Essen S., Brookes S. M., Irvine R. M., Spackman E., Ridgeon J., Gardner R., Hanna A., Suarez D. L., Brown I. H.: Real-time reverse transcription (RRT)-polymerase chain reaction (PCR) methods for detection of pandemic (H1N1) 2009 influenza virus and European swine influenza A virus infections in pigs. *Influenza Other Respir. Viruses* 2010, 4, 277-293.
37. Sirois M., Lemire E. G., Levesque R. C.: Construction of a DNA probe and detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by using polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 1991, 29, 1183-1187.
38. World Organisation for Animal Health (OIE) (2015). Manual of diagnostic tests for aquatic animals, 17th Ed. OIE, Paris. Dostęp pod adresem: www.oie.int/international-standard-setting/aquatic-manual/access-online/. (dostęp 25.08.2016).
39. Woźniakowski G., Frączyk M., Kowalczyk A., Pomorska-Mól M., Pejsak Z.: Polymerase cross-linking spiral reaction (PCLSR) for detection of African swine fever virus (ASFV) in pigs and wild boars. *Nat. Sci. Rep.* 2016 (w druku).
40. Woźniakowski G., Kozdrun W., Samorek-Salamonowicz E.: Loop-mediated isothermal amplification for the detection of goose circovirus. *Virol. J.* 2012, 9, 110. DOI:10.1186/1743-422X-9-110.
41. Wright C. F., Morelli M. J., Thébaud G., Knowles N. J., Herzyk P., Paton D. J., Haydon D. T., King D. P.: Beyond the consensus: dissecting within-host viral population diversity of foot-and-mouth disease virus by using next-generation genome sequencing. *J. Virol.* 2011, 85, 2266-2275.
42. Yoshida H., Sakoda Y., Endo M., Motoshima M., Yoshino F., Yamamoto N., Okamatsu M., Soejima T., Senba S., Kanda H., Kida H.: Evaluation of the reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) as a screening method for the detection of influenza viruses in the fecal materials of water birds. *J. Vet. Med. Sci.* 2011, 73, 753-758.
43. Zhou W., Gao S., Podgórska K., Stądziejek T., Qiu H. J., Yin H., Drew T., Liu L.: Rovac is the possible ancestor of the Russian lapinized vaccines LK-VNIVViM and CS strains but not the Chinese strain (C-strain) vaccine against classical swine fever. *Vaccine* 2014, 20, 6639-6642.

Adres autora: dr hab. Grzegorz Woźniakowski prof. nadzw., Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy; e-mail: grzegorz.wozniakowski@piwet.pulawy.pl