

Karakterisasi Kultur Virus *African Swine Fever* Sampel Lapang Indonesia Menggunakan Sel Primer Leukosit Babi

Characterization of Indonesian Field Sample of African Swine Fever Virus Culture using Primary Porcine Leukocyte Cell Cultures

Atik Ratnawati¹², Risza Hartawan², Indrawati Sendow², Nur Syabiq Assadah³, Harimurti Nuradji²,
Ni Luh Putu Indi Dharmayanti², I Wayan Teguh Wibawan⁴, Ni Luh Putu Ika Mayasari^{4*}

¹Program Studi Doktor Ilmu Biomedis Hewan, Sekolah Pascasarjana, IPB University,
Bogor, Jawa Barat, Indonesia

²Pusat Riset Veteriner, Organisasi Riset Kesehatan, Badan Riset dan Inovasi Nasional,
Bogor, Jawa Barat, Indonesia

³Balai Besar Perakitan dan Modernisasi Veteriner, Kementerian Pertanian, Bogor, Jawa Barat, Indonesia

⁴Divisi Mikrobiologi Medik, Sekolah Kedokteran Hewan dan Biomedis, IPB University,
Bogor, Jawa Barat, Indonesia

*Corresponding author; Email: ni_luhma@apps.ipb.ac.id.

Naskah diterima: 1 Agustus 2025, direvisi: 24 November 2025, disetujui: 30 November 2025

Abstract

African Swine Fever (ASF) is a highly contagious and deadly viral disease in pigs, caused by the African Swine Fever virus (ASFV). Since 2018, the disease has spread and caused large socioeconomic consequences to the pig industry in several Asian countries, including China, Vietnam, and Indonesia. This study aims to isolate ASFV from field sample using primary porcine leukocyte cells culture, identify the characteristics of ASFV propagation *in vitro* and leukocyte cells response to ASFV inoculation. Leukocyte cells were collected from the blood of a healthy donor pig and cultured in homologous plasma medium. Propagation was carried out by inoculating the field sample with code Indonesia/2022/Pig/PSJ into confluent cultures (70-80%) of primary porcine leukocyte cell cultures. Cell morphology was observed under a light microscope every 24, 48, 72, 96, 120, 144, and 164 hours post-inoculation (hpi). The field sample from primary porcine leukocyte cell cultures was purified using the Percoll method. A virus pellet was detected for ASFV using a qPCR test. The results showed morphological changes in the infected primary leukocyte cells, with a hemadsorption reaction (HAD) observed at 48 hpi, compared to non-infected control cells. The binding of porcine erythrocytes to the surface of ASF-infected cells formed rosette-like structures. The hemadsorption reaction (HAD) could be observed after 2 blind passages. Purification of the ASFV using Percoll improved the virus purity, as indicated by a lower Ct value compared to the supernatant from primary porcine leukocyte cell cultures.

Keywords: African Swine Fever Virus; blind passage; hemadsorption; Percoll purification; qPCR

Abstrak

African Swine Fever (ASF) merupakan penyakit viral yang sangat menular dan mematikan pada babi, yang disebabkan oleh virus *African Swine Fever* (ASF). Sejak tahun 2018, penyakit ini telah menyebar dan menyebabkan konsekuensi sosial ekonomi yang besar terhadap industri babi di beberapa negara Asia, termasuk China, Vietnam, dan Indonesia. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan isolasi virus ASF dari sampel lapang menggunakan kultur sel primer leukosit babi, identifikasi karakteristik hasil propagasi virus ASF secara *in vitro* dan respon sel leukosit terhadap inokulasi virus ASF. Sel leukosit dikoleksi dari darah babi

donor yang sehat dan dikultur dalam medium plasma homolog. Propagasi dilakukan dengan menginokulasikan sampel lapang dengan kode Indonesia/2022/Pig/PSJ ke kultur sel primer leukosit babi yang konfluen (70-80%). Pengamatan morfologi sel dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya setiap 24, 48, 72, 96, 120, 144, and 164 jam pasca inokulasi (jpi). Sampel lapang dari kultur sel primer leukosit babi dipurifikasi dengan menggunakan metode Percoll. Pelet virus di deteksi virus ASF dengan menggunakan uji qPCR. Hasil penelitian menunjukkan adanya perubahan morfologis pada sel primer leukosit yang terinfeksi, dengan adanya reaksi hemadsorpsi (HAD) yang teramati pada 48 jpi, dibandingkan dengan sel kontrol yang tidak terinfeksi. Pengikatan eritrosit babi ke permukaan sel yang terinfeksi virus ASF, membentuk *rosette-like structure*. Reaksi hemadsorpsi (HAD) dapat diamati setelah 2 kali *blind passage*. Purifikasi virus ASF menggunakan Percoll dapat meningkatkan kemurnian virus yang ditandai dengan nilai Ct yang lebih rendah dibandingkan dengan supernatant hasil kultur sel primer leukosit babi.

Kata kunci: blind passage; hemadsorpsi; purifikasi Percoll; qPCR; virus ASF

Pendahuluan

African swine fever (ASF) merupakan penyakit hemoragik parah baik pada babi domestik dan babi liar yang disebabkan oleh virus *African swine fever* (ASFV). Virus ASF merupakan virus DNA rantai ganda yang termasuk genus *Asfivirus* dan famili *Asfarviridae* (Alonso *et al.* 2018). Wabah penyakit ASF berdampak besar pada peternakan dan industri babi karena tingginya tingkat morbiditas dan mortalitas dengan durasi yang sangat cepat. Infeksi berulang seringkali terjadi pada peternakan babi yang terserang, menyebabkan waktu pemulihan akibat wabah penyakit menjadi lama dan berbiaya tinggi. Hal ini diperparah dengan belum adanya vaksin yang efektif untuk pencegahan penyakit ASF (Monteagudo *et al.* 2017; Nguyen-Thi *et al.* 2021).

Sebanyak 24 genotipe virus ASF telah teridentifikasi berdasarkan analisis filogenetik dari fragmen *variable region* gen *B646L*, yang mengkode protein p72. Hampir semua genotipe virus tersebut bersifat endemik di Afrika, dimana hanya genotipe I dan II yang telah menyebar ke seluruh dunia terutama ke Eropa, Amerika, dan Asia (Li *et al.* 2022). Penyakit ini dapat menyebar melalui penularan secara langsung dari hewan yang terinfeksi maupun penularan secara tidak langsung melalui produk daging babi atau *formites* yang terkontaminasi. Penularan penyakit juga dapat terjadi melalui vektor caplak lunak *Ornithodoros spp* (Couacy-Hymann *et al.* 2019; Dixon *et al.* 2019; Mazloun *et al.* 2021).

Pada bulan Juni 2007, wabah ASF oleh genotipe II dikonfirmasi di wilayah Kaukasus

(Georgia). Virus ASF kemudian menyebar dengan cepat ke Armenia pada bulan Agustus 2007 dan ke Rusia pada bulan November 2007 (Gaudreault *et al.* 2020). Pada tahun 2018, virus ASF memasuki China yang merupakan negara dengan populasi babi terbesar di dunia (Zhou *et al.* 2019; WOA 2021). Selanjutnya, penyakit ini dengan cepat menyebar ke berbagai negara di kawasan Asia lainnya seperti Mongolia, Vietnam, Kamboja, Hong Kong, Myanmar, Filipina, Korea, Timor Leste, Indonesia, Papua Nugini, India menyebabkan kematian jutaan babi di berbagai wilayah yang terinfeksi (Gaudreault *et al.* 2020; Patil *et al.* 2020; Dharmayanti *et al.* 2021; Qiu *et al.* 2021). Di Indonesia, wabah ASF dilaporkan terjadi di berbagai wilayah seperti Sumatera, Jawa, Kalimantan, Bali, Nusa Tenggara hingga Papua. Sebagai imbasnya, industri peternakan babi mengalami kerugian ekonomi yang besar. Kekurangan pasokan daging babi dilaporkan diberbagai wilayah atau daerah di Indonesia.

Pengendalian penyakit ASF yang efektif membutuhkan pendekatan multi disiplin ilmu yang saling terkait. Salah satunya adalah karakterisasi virus ASF yang bersirkulasi di lapangan. Upaya isolasi virus ASF sangat berguna untuk tahapan penelitian selanjutnya seperti pengembangan vaksin dan perangkat diagnostik penyakit. Umumnya, virus ASF ditumbuhkan pada sel primer babi seperti *Swine pulmonary alveolar macrophages* (PAMs), *Swine leucocyte* (SL), dan *transplantable hybrid cell line* (A4C2/9k) (Balyshev *et al.* 2018; Mazur Panasiuk dan Woźniakowski 2019; Zhao *et al.* 2019). Penggunaan kultur sel lestari seperti

Pig Kidney (PK) dapat digunakan namun tidak sensitif (Cabezón *et al.* 2017). Selain itu, kultur sel dari spesies lain seperti *chicken embryo fibroblast* (CEF) dan *baby hamster kidney fibroblast* (BHK-21) juga tidak sensitif untuk isolasi dan identifikasi isolat lapang (Kameyama *et al.* 2022). Menurut Puzankova *et al.* (2023), virus ASF tidak dapat bereplikasi pada kultur sel manusia, hamster, tikus, dan anjing. Namun penelitian-penelitian lain menunjukkan bahwa *African green monkey epithelial kidney cells* (Vero) dan *African green monkey fibroblast kidney cells* (CV-1) dapat digunakan untuk atenuasi virus ASF genotipe I (Meloni *et al.* 2022; Olesen *et al.* 2022; Lee *et al.* 2024).

Permasalahan sulitnya penumbuhan virus ASF secara *in vitro* pada sel kultur yang umum digunakan mendorong alternatif lain untuk isolasi virus terutama dari sampel lapang. Salah satu pendekatan yang telah dilakukan adalah penggunaan kultur sel primer leukosit babi (Carrascosa *et al.* 2011; Driesbeke *et al.* 2024). Pendekatan ini dilakukan karena virus ASF secara alami menginfeksi dan bereplikasi dalam monosit dan makrofag di beberapa organ seperti limpa, kelenjar getah bening, paru-paru, dan ginjal (Meloni *et al.* 2022; Driesbeke *et al.* 2024). Monosit dan makrofag merupakan target utama infeksi virus pada babi. Virus ASF juga bereplikasi pada sel endotel, hepatosit, sel epitel tubulus ginjal, dan neutrophil (Sánchez-Vizcaíno *et al.* 2015). Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk melakukan isolasi virus ASF yang berasal dari sampel lapang menggunakan kultur sel primer leukosit babi dan karakterisasi hasil propagasinya secara *in vitro*, serta respon sel leukosit babi terhadap virus ASF asal Indonesia.

Materi dan Metode

Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Virologi, Balai Besar Penelitian Veteriner (BBLitvet), Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, Kementerian Pertanian, Bogor, Jawa Barat dan Laboratorium Genomik, Badan Nasional dan Inovasi Nasional (BRIN), Cibinong, Jawa Barat dengan periode waktu dari Juli 2022 sampai dengan Juni 2023.

Persetujuan Etik Hewan

Penelitian ini telah disetujui oleh Komisi Etik Bidang Pemeliharaan dan Penggunaan Hewan BRIN No.100/KE.02/SK/12/2022.

Pemeliharaan Babi Donor

Babi donor berjenis kelamin jantan sebanyak 1 ekor berumur 2 bulan dengan berat badan berkisar 25 kg dipelihara dalam fasilitas kandang babi di BBLitvet. Pakan harian berupa konsentrat diberikan 2 kali per hari dengan air minum *ad libitum*. Babi donor telah diperiksa secara klinis dan dipastikan tidak memiliki antibodi terhadap virus ASF dengan uji serologis *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) (Ingezim PPA Compac®). Sampel darah babi dikoleksi melalui vena jugularis eksterna dan ditampung dalam tabung EDTA 10 mL.

Persiapan Sampel untuk Isolasi Virus ASF

Virus ASF *strain* Indonesia berasal dari sampel klinis wabah penyakit ASF di Kota Pematang Siantar, Provinsi Sumatera Utara pada tahun 2022. Sampel organ limpa dengan kode Indonesia/2022/Pig/PSJ dibuat suspensi 10% dengan larutan *phosphate buffer salina* (PBS) steril, disaring dengan filter 0.22 μm (Millipore™) dan digunakan sebagai inokulum.

Pembuatan Kultur Sel Primer Leukosit Babi

Pembuatan kultur sel primer leukosit babi sesuai metode Malmquist dan Hay (1960). Tabung sentrifus 15 mL berisi darah babi disentrifugasi kecepatan 2.500 RPM selama 30 menit pada suhu 4°C. Darah hasil sentrifugasi terbagi menjadi 3 fraksi (plasma, *buffy coat*/leukosit, eritrosit) dikoleksi dalam 3 tabung berbeda. Sel leukosit ditambah 3 mL NH_4Cl 0,83%, dihomogenkan dan diinkubasi suhu dingin selama 15 menit. Larutan disentrifugasi kecepatan 2.000 RPM selama 15 menit. Proses pencucian endapan sel leukosit sebanyak 3× dengan membuang supernatan yang diperoleh. Endapan sel leukosit diencerkan dengan 1 mL plasma babi. Jumlah sel leukosit (1:10) dihitung dengan kamar hitung Neubaur dengan pewarnaan trypan blue. Sel leukosit dihitung dan disesuaikan konsentrasinya ke konsentrasi final 8-10 juta leukosit per mL. Sebanyak

200 μ L suspensi sel leukosit didistribusikan ke setiap *well* pada mikropelat 96-*well flat bottom* (Falcon®), diinkubasi dengan inkubator (Memmert®) pada suhu 37°C dengan kadar CO₂ 5%. Pertumbuhan sel leukosit diamati setiap 24 jamnya hingga mencapai konfluen.

Propagasi *In Vitro* Virus ASF Menggunakan Kultur Sel Primer Leukosit Babi

Sebanyak 20 μ L inokulum sampel lapang dengan kode Indonesia/2022/Pig/PSJ diinokulasikan pada kultur sel primer leukosit babi dalam mikropelat 96-*well* yang sudah konfluen 70-80%. Kontrol negatif berupa kontrol sel leukosit babi tanpa ditambah eritrosit babi (1%) dan kontrol sel leukosit babi ditambah eritrosit babi (1%). Replikasi tiga kali (triplo) untuk setiap kondisi kontrol dan sampel. Dua jam pasca inokulasi, sebanyak 20 μ L eritrosit babi 1% ditambahkan ke setiap *well* dan diinkubasi pada suhu 37°C dengan kadar CO₂ sebesar 5%. Kultur sel primer leukosit babi yang sudah diinokulasi virus ASF diamati setiap hari selama 7 hari untuk memeriksa keberadaan hemadsorpsi (HAD) sel eritrosit (Carrascosa *et al.* 2011).

Uji Infektivitas dengan Hemadsorpsi pada Sel Leukosit babi

Uji hemadsorpsi (HAD) dilakukan berdasarkan Carrascosa *et al.* (2011). Sel primer leukosit babi di-resuspensi dalam media kultur 10% plasma babi dan 10 μ L inokulum sampel lapang dengan kode Indonesia/2022/Pig/PSJ per *well* dalam mikropelat 96-*well flat bottom* (Falcon®) sebagai stok. Kultur virus dalam mikropelat 96 stok kemudian diinkubasi dengan menggunakan inkubator CO₂ pada suhu 37°C selama 48 jam. Pengenceran 10 kali (volume final 200 μ L) dilakukan dengan menggunakan kultur virus dalam mikropelat 96 stok. Sebanyak 180 μ L per *well* media kultur plasma dimasukkan dalam mikropelat 96-*well flat bottom* baru. Sebanyak 20 μ L kultur virus stok selanjutnya ditambahkan ke dalam *well* pertama dan larutan dihomogenkan. Sebanyak 20 μ L larutan dipindahkan ke *well* berikutnya. Tahapan ini diulangi untuk menghasilkan serial pengenceran mulai dari konsentrasi 1/10, 1/100, 1/1.000, 1/10.000 dan 1/100.000. Setelah diinkubasi

selama 2 jam pada suhu 37°C, sebanyak 5 μ L sel eritrosit ditambahkan ke setiap *well* mikropelat 96, mulai dari pengenceran yang kurang pekat. Mikropelat 96 kemudian diinkubasi selama 3–4 hari dan diperiksa reaksi hemadsorpsi (HAD) dengan adanya pembentukan *rosette-like structure* menggunakan mikroskop cahaya pada perbesaran 10 $\times$. Keberadaan sel yang terinfeksi pada pengenceran virus ASF dalam kultur sel leukosit babi dideteksi dengan menggunakan qPCR ASF pada gen *B646L* (p72).

Purifikasi Virus ASF

Purifikasi virus ASF dari kultur sel primer leukosit babi dengan metode Percoll (Carrascosa *et al.* 2011). Larutan Percoll 45% dibuat dengan campuran 3,6 mL Percoll, 0,7 mL 10 $\times$ PBS steril dan 2,7 mL air deionisasi steril. Larutan Percoll 45% ditambah 1 mL kultur virus, dihomogenkan dan dilakukan ultrasentrifugasi dengan kecepatan 40.000 G selama 30 menit pada suhu 4°C, menggunakan rotor SW 40 Ti *swinging-bucket* pada mesin Beckman Coulter®. Hasil pelet virus dikoleksi. Larutan Percoll 45% yang baru dibuat dengan campuran 3,15 mL Percoll, 0,7 mL 10 $\times$ PBS, dan 3,15 mL air deionisasi steril. Pelet virus dimasukkan kembali ke dalam larutan Percoll 45% dan dilakukan ultrasentrifugasi dengan kecepatan 40.000 G selama 30 menit pada suhu 4°C. Pelet virus selanjutnya diresuspensi dalam 500 μ L PBS 1 $\times$ steril dan dilakukan deteksi virus ASF menggunakan qPCR.

Deteksi Virus ASF Menggunakan Uji qPCR Gen *B646L* (p72)

Deteksi virus ASF menggunakan uji qPCR dengan target gen *B646L* (p72) sesuai King *et al.* (2003). Primer dan probe yang digunakan yaitu *forward primer* 5' CTGCTCATGGTATCAATCTTATCGA 3' *reverse primer* 5' GATACCACAAGATCRG CCGT3', dan *probe* FAM-GATACCACAAGAT CRGCCGT-BHQ1. Kontrol positif berasal dari IAEA dan NTC untuk kontrol negatif. Material genetik virus ASF diisolasi dari sampel hasil kultur *in vitro* dan pelet virus menggunakan DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen). Master mix menggunakan iTaq™ Universal Probes Supermix (Bio-Rad). Sebanyak 2 μ L templat

DNA ditambahkan ke dalam reaksi *PCR mix* dengan volume akhir sebanyak 20 μ L yang terdiri dari 1 $\times$ iQ *Supermix*, 400 nM masing-masing primer, dan 250 nM probe. Reaksi PCR dilakukan dengan dengan mesin CFX96 Touch (Bio-Rad). Suhu amplifikasi terdiri atas denaturasi awal pada suhu 95° C selama 5 menit dan 40 siklus amplifikasi (95°C selama 15 detik dan 58°C selama 30 detik). Fluoresensi dibaca pada saat suhu 58°C. Amplifikasi dianggap positif pada nilai Ct $\leq$ 38.

Hasil dan Pembahasan

Kultur Sel Primer Leukosit Babi

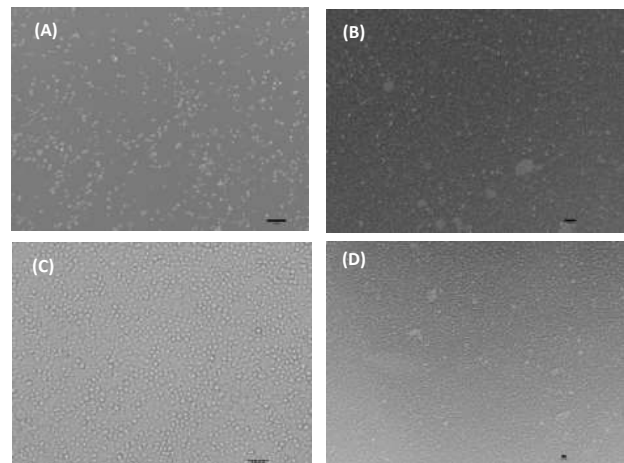
Kultur sel primer leukosit babi penting untuk diagnosis dan penelitian virus ASF, karena virus ASF tidak tumbuh dengan baik di banyak sel lestari. Kultur sel primer leukosit babi dibuat dengan menggunakan darah babi. Penggunaan darah EDTA dalam pembuatan sel primer leukosit diharapkan tidak memiliki inhibitor dibanding antikoagulan lainnya. Sel primer leukosit babi diperoleh setelah memisahkan *buffy coat* dari eritrosit dan plasma (Gambar 1). Plasma sebagai media penumbuh sel primer leukosit, sedangkan larutan eritrosit dalam PBS steril (1:10) digunakan sebagai media identifikasi virus ASF. Penggunaan *buffy coat* dengan komponen utama leukosit lebih disukai karena sensitif terhadap virus ASF tanpa adaptasi awal serta tanpa terminasi babi. Pada proses pencucian sel primer leukosit, penambahan larutan NH_4Cl 0,83% berfungsi untuk melisis kontaminan eritrosit dan mencegah hilangnya viabilitas leukosit (Leon *et*



Gambar 1. Hasil sentrifugasi dengan tampilan 3 fraksi pemisahan darah babi yang terdiri atas plasma, *buffy coat*/ leukosit dan eritrosit. *Buffy coat* setelah proses sentrifugasi ditunjukkan dengan tanda anak panah.

al. 2013). Hasil penghitungan jumlah sel primer leukosit yang berasal dari suspensi sel leukosit sebanyak 9.975.000/mL, jumlah ini masih dalam rentang konsentrasi final sel leukosit.

Hasil pengamatan dengan mikroskop cahaya menunjukkan sel primer leukosit menempel di bagian bawah mikroplat 96-*well flat bottom*, berbentuk bulat, dan membiaskan cahaya di sekitar membrannya (Gambar 2). Setelah 3 hari diamati, sel primer leukosit yang menempel berkisar 70-80% konfluen, artinya 70-80% permukaan mikroplat 96 tertutup sel *monolayer*. Pada fase ini, sel primer leukosit siap diinokulasi dengan virus ASF. Sebaliknya, jika sel primer leukosit terlalu konfluen (90%) dan sel menutupi sebagian besar mikroplat 96 tanpa celah dan ruang, maka sel mulai mati. Jika sel primer leukosit tumbuh dalam beberapa hari tetapi belum konfluen (<70%), maka perlu penggantian media untuk nutrisi dan menjaga pH.



Gambar 2. Pengamatan kultur sel primer leukosit babi dengan mikroskop cahaya. (A) 24 jam, sel primer leukosit 20% konfluen, (B) 48 jam, sel primer leukosit 50% konfluen, (C) 72 jam, sel primer leukosit 70-80% konfluen (D) 96 jam, sel primer leukosit 90% konfluen.

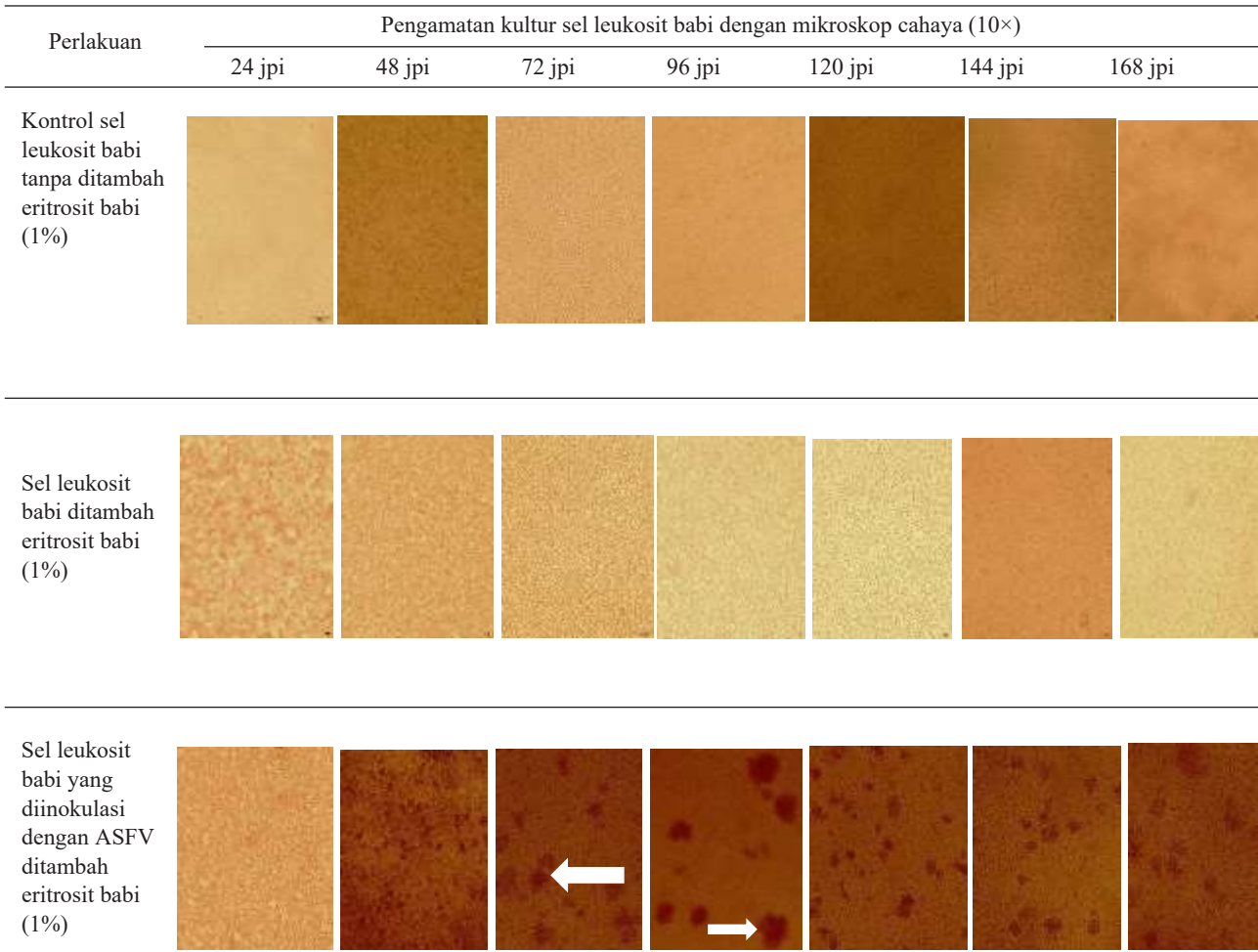
Propagasi *In Vitro* Virus ASF Strain Indonesia Menggunakan Kultur Sel Primer Leukosit Babi

Propagasi virus ASF secara *in vitro* dilakukan dengan inokulasi sampel lapang ke kultur sel primer leukosit babi yang sensitif terhadap virus ASF. Jika terdapat virus ASF, virus akan bereplikasi di dalam sel dan menyebabkan efek sitopatik. Sel target utama untuk replikasi virus ASF pada babi

merupakan *monocyte macrophage lineage*. Sel ini meliputi makrofag yang bersirkulasi dalam darah (monosit) dan makrofag jaringan. Proses maturasi dan diferensiasi *in vitro* monosit darah babi menjadi makrofag dikaitkan dengan peningkatan kerentanan terhadap infeksi virus ASF (Sánchez *et al.* 2017; Yoo *et al.* 2020; Zhu *et al.* 2024). Inokulasi sampel lapang dengan kode Indonesia/2022/Pig/PSJ pada kultur sel primer leukosit babi menunjukkan efek sitopatik yang jelas, ditandai dengan hemadsorpsi (HAD) (Gambar 3). Sampel lapang dengan kode Indonesia/2022/Pig/PSJ yang digunakan berasal dari sampel organ limpa babi. Limpa dan limfonodus merupakan target utama dari virus ASF. Virus ASF *wild type* dari lapang hingga saat ini tidak mudah dipropagasi dalam sel lestari, sebaliknya, sel primer leukosit babi mampu menyediakan lingkungan yang mendekati atau meniru kondisi alami bagi virus ASF untuk berkembang biak secara *in vitro* (Droesbeke *et al.*

2024). Virus ASF dapat bereplikasi di sel lestari dengan efikasi yang rendah (Meloni *et al.* 2022).

Kultur sel primer leukosit babi diamati untuk mengetahui adanya hemadsorpsi (HAD) di bawah mikroskop perbesaran rendah (10×). Pengamatan pertama dilakukan 15–18 jam pasca inokulasi (jpi), dilakukan kurang dari 24 jpi untuk mengetahui adanya kontaminasi, dilanjutkan pada 48, 72, 96, 120, 144, dan 168 jpi. Fenomena hemadsorpsi (HAD) didasarkan pada pengikatan eritrosit babi di permukaan sel yang terinfeksi virus ASF dengan visualisasi *haemadsorbing effect* atau pembentukan *rosette-like structure*. Sel primer leukosit terinfeksi tampak dikelilingi oleh sel eritrosit yang membentuk pola melingkar atau menjari seperti kelopak bunga (roset). Hemadsorpsi (HAD) ini membedakan virus ASF dari agen lain yang menyebabkan penyakit dengan gejala mirip dengan ASF. Hasil positif virus ASF dari sampel lapang dengan kode Indonesia/2022/



Gambar 3. Gambaran kultur sel primer leukosit babi yang diinokulasi dengan virus ASF *strain* Indonesia/2022/Pig/PSJ. Visualisasi hemadsorpsi (HAD) dapat diamati pada 48 jpi. Pembentukan *rosette-like structure* diberi tanda dengan anak panah.

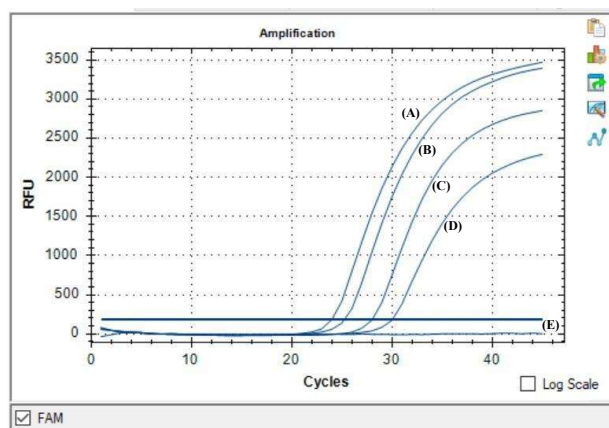
Pig/PSJ ditandai dengan hemadsorpsi (Gambar 3). Jika tidak ada manifestasi hemadsorpsi (HAD) dalam kultur sel yang diinokulasi selama periode pengamatan, maka dilakukan dua kali pasase tambahan atau *blind passage* dalam kultur sel leukosit. Serial pasase virus ASF dapat meningkatkan adaptasi dan replikasi virus ASF asal lapang secara *in vitro*. Setelah pasase ketiga, jika tidak ada hemadsorpsi (HAD) yang diamati, hasil propagasi virus dianggap negatif. Hal ini mempertimbangkan bahwa virus ASF *strain* Indonesia/2022/Pig/PSJ memiliki sifat hemadsorpsi (HAD) yang merupakan karakteristik genotipe 2 yang bersifat akut.

Virus ASF tidak hanya menginfeksi makrofag tetapi juga eritrosit babi yang terinfeksi. Eritrosit penting dalam patogenesis virus ASF karena infeksi menyebabkan *hemorrhagic fever* yang merupakan ciri khas infeksi virus ASF. Fenomena hemadsorpsi (HAD) dikaitkan dengan dua gen virus ASF yaitu gen *EP402R* dan *EP153R*. Gen *EP402R* dan *EP153R* mengkode protein transmembran pEP402R dan pEP153R untuk replikasi, virulensi, dan interaksi virus ASF dengan inang. Gen *EP153R* (pEP153R) berperan ketika *viral attachment and entry* atau memodulasi lingkungan sel inang untuk mendukung replikasi virus dalam eritrosit. Gen *EP402R* (pEP402R) meningkatkan pengikatan partikel virus ASF ke eritrosit untuk persistensi dan virulensi virus serta mempertahankan viremia (Wang *et al.* 2021; Petrovan *et al.* 2022; Urbano dan Ferreira 2022)

Infektivitas Hemadsorpsi pada Sel Laukosit Babi

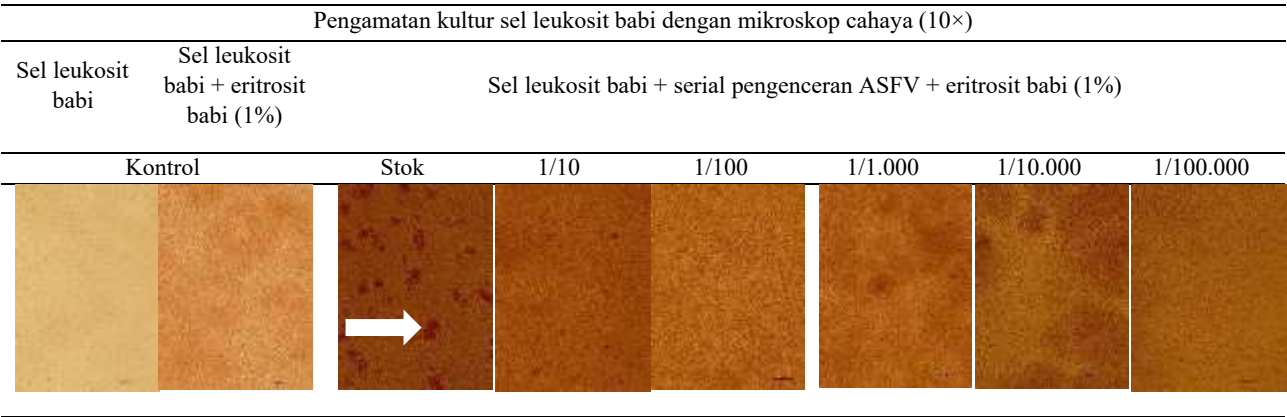
Virus ASF hasil propagasi virus ASF dari sampel lapang kode Indonesia/2022/Pig/PSJ dengan serial pengenceran dari supernatan kultur sel primer leukosit babi di deteksi menggunakan qPCR dengan target gen *B646L* (p72). Hasil positif qPCR ASF ditunjukkan oleh supernatan tanpa pengenceran (stok) dengan nilai Ct 31,28 dan pengenceran pada konsentrasi 1/10 dengan nilai Ct 35,01. Hasil pengenceran pada konsentrasi 1/100 dengan nilai Ct 39,67 dianggap negatif karena qPCR ASF mempunyai ambang batas nilai Ct > 38. Pengenceran dengan konsentrasi 1/1.000, 1/10.000, 1/100.000 dan kontrol negatif menunjukkan hasil qPCR negatif

(Gambar 4). Hal ini menunjukkan bahwa limit deteksi qPCR ASF dengan pengenceran paling rendah pada konsentrasi 1/10 dimana DNA target dapat dideteksi positif. Hal ini mengingat qPCR mendeteksi DNA virus, baik dari virus yang masih infeksi maupun yang sudah rusak atau tidak infeksi.



Gambar 4. Deteksi virus ASF *strain* Indonesia/2022/Pig/PSJ dari serial pengenceran virus ASF yang diinokulasikan pada kultur sel primer leukosit babi dengan qPCR ASF gen *B646L* (p72). (A) Virus stok, Ct 31,28. (B) Pengenceran virus 1/10, Ct 35,01. (C) Pengenceran virus 1/100, Ct 39,67. (D) Kontrol negatif. Fluor FAM untuk ASF.

Hasil qPCR ASF ini berbeda dengan reaksi hemadsorpsi (HAD), reaksi hemadsorpsi (HAD) yang ditandai dengan pembentukan *rosette-like structure* hanya terjadi pada kultur sel primer leukosit babi yang diinokulasi dengan virus ASF stok atau tanpa pengenceran. Reaksi hemadsorpsi (HAD) tidak terjadi pada kultur sel primer leukosit babi yang diinokulasi dengan virus ASF pada serial pengenceran dengan konsentrasi 1/10 sampai dengan 1/100.000 (Gambar 5). Hal ini terjadi antara lain karena jumlah virus tidak mencukupi untuk infeksi sel secara efektif karena tidak semua sel dalam kultur menjadi terinfeksi. Ekspresi protein hemadsorpsi pEP402R pada permukaan sel menurun karena hanya sedikit sel yang mengeluarkan pEP402R sehingga interaksi dengan eritrosit belum cukup kuat untuk terlihat sebagai hemadsorpsi (HAD). Waktu inkubasi belum cukup lama. Waktu untuk menghasilkan efek hemadsorpsi (HAD) akan lebih lama pada konsentrasi rendah, karena replikasi virus berjalan lambat dan perlu waktu lebih lama untuk menghasilkan protein yang cukup banyak.



Gambar 5. Gambaran kultur sel primer leukosit babi yang diinokulasi dengan serial pengenceran virus ASF *strain* Indonesia/2022/Pig/PSJ. Visualisasi hemadsorpsi (HAD) hanya terjadi pada sel primer leukosit babi yang diinokulasi dengan virus ASF stok ditambah dengan eritrosit babi 1%. Pembentukan *rosette-like structure* diberi tanda dengan anak panah.

Infektivitas virus ASF pada sel leukosit babi ditandai dengan kemampuan virus untuk menginfeksi dan bereplikasi dalam sel tersebut melalui fenomena hemadsorpsi (HAD) atau deteksi replikasi virus menggunakan metode qPCR. Inokulasi leukosit babi dengan serial pengenceran untuk mengamati dosis minimal infeksi. Dalam uji hemadsorpsi (HAD) ini, serial pengenceran virus diinokulasi ke dalam sel kemudian ditambahkan sel eritrosit. Fenomena hemadsorpsi (HAD) ini dapat dilihat di bawah mikroskop. Serial pengenceran virus juga digunakan dalam uji qPCR untuk mendeteksi keberadaan virus dalam sampel. Dengan serial pengenceran, konsentrasi virus dapat disesuaikan untuk mendapatkan hasil qPCR yang optimal. Pengenceran juga digunakan untuk mempelajari efek virus ASF pada sel atau jaringan. Dengan menginfeksi sel dengan pengenceran virus yang berbeda, dapat diamati bagaimana virus berkembang biak dan menyebabkan kerusakan pada sel (Olesen *et al.* 2022; Driesbeke *et al.* 2024).

Purifikasi Virus ASF *Strain* Indonesia

Supernatan kultur sel primer leukosit babi yang terinfeksi virus ASF biasanya mengandung kontaminan seluler karena aktivitas biologis normal sel serta sifat sitolitik virus. Kontrol yang tepat dari kultur sel digunakan untuk mengurangi masalah tersebut. Gradien sentrifugasi Percoll[®] yang mengandung partikel silika koloid dilapisi dengan polivinilpirolidon, digunakan untuk purifikasi virus ASF (Carrascosa *et al.* 1985). Metode ini menghilangkan hampir semua kontaminan seluler dan banyak digunakan

dalam penelitian analisis proteomik partikel virus, epigenetik, dan analisis mikroskopi krio-elektron virion virus ASF. Hasil purifikasi suspensi virus ASF *strain* Indonesia/2022/Pig/PSJ berupa pelet virus warna putih. Pelet virus ASF selanjutnya dilarutkan dengan volume 1× PBS dingin.

Metode purifikasi partikel virus ASF antara lain ekstraksi fluorocarbon, isoelektrik, presipitasi polietilen glikol, sentrifugasi sukrosa dan sukrosa-cesium klorida, serta sentrifugasi kalium tartrate (León *et al.* 2013). Namun tidak ada satu pun yang berhasil memulihkan infektivitas virus dan murni dari kontaminan seluler. Menurut Carrascosa *et al.* (1985), tahapan metode purifikasi menggunakan sentrifugasi gradien Percoll terdiri atas penghilangan membran sel kontaminan dan pemulihan partikel virus ASF infeksius dari virion ekstraseluler yang diproduksi dalam sel leukosit yang terinfeksi. Secara singkat, virus ekstraseluler yang diproduksi dalam sel leukosit yang tumbuh dan terinfeksi oleh virus ASF *strain* Indonesia/2022/PSJ dijernihkan untuk menghilangkan serpihan sel dan dipekatkan dengan sedimentasi berkecepatan tinggi. Pelet virus ASF yang terkonsentrasi kemudian disentrifugasi pada gradien densitas Percoll (45%) dan diperoleh hasil partikel virus dengan densitas 1,090 g/ml. Kontaminan sel berupa fragmen membran dan vesikel mempunyai pita fraksi heterogen pada densitas 1,02 hingga 1,08 g/ml (Carrascosa *et al.* 1985).

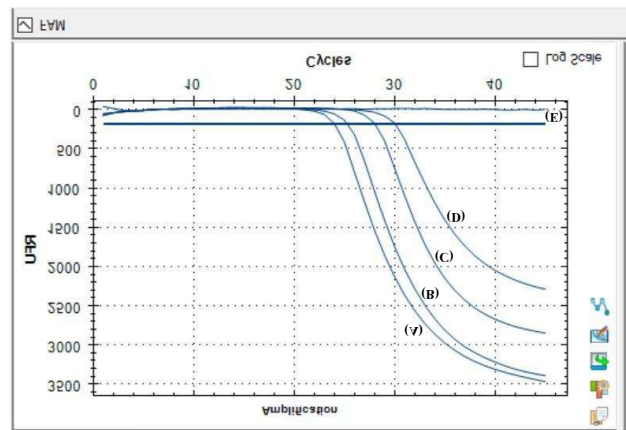
Metode Percoll digunakan untuk purifikasi virus ASF karena memiliki sifat-sifat yang

diperlukan untuk kelangsungan hidup virus, seperti dapat dibuat dalam berbagai densitas, tidak toksik, tidak dapat menembus membran sel, dapat disteril, meningkatkan kemurnian virus, dan tidak mempunyai efek berlawanan terhadap proses pemisahan. Selain itu teknik sentrifugasi juga mempertimbangkan kebutuhan untuk memulihkan virus secara optimal, tanpa adanya kerusakan yang timbul akibat pembentukan pelet virus setelah proses sentrifugasi. Penambahan media pada proses sentrifugasi berfungsi untuk menekan pengaruh lingkungan seperti temperatur dan kekuatan sentrifugasi.

Deteksi Virus ASF Menggunakan Uji qPCR Gen *B646L* (p72)

Supernatan kultur sel primer leukosit babi, organ limpa dan hasil purifikasi dengan Percoll virus ASF *strain* Indonesia/2022/Pig/PSJ di deteksi dengan uji qPCR ASF gen *B646L* (p72). Hasil positif qPCR ASF ditunjukkan oleh ketiga sampel tersebut (Gambar 6). Sampel lapang dengan kode Indonesia/2022/Pig/PSJ yang berasal dari organ limpa sudah dideteksi dengan uji qPCR ASF gen *B646L* (p72) sebelum dipropagasi dalam sel primer leukosit babi. Virus ini juga sudah dikarakterisasi genetik berdasarkan gen *B646L* (p72) dan *E183L* (p54) dengan *accession number* PQ.145174 dan PQ.145178.

Berdasarkan hasil qPCR gen *B646L* (p72), virus ASF *strain* Indonesia/2022/Pig/PSJ hasil propagasi pada kultur sel primer leukosit babi berhasil dideteksi dengan nilai *cycle threshold* (Ct) 30,04. Virus ASF juga dideteksi dari hasil purifikasi dengan Percoll (Ct 28,03) dan dari organ limpa babi yang terinfeksi (Ct 25,24) (Gambar 6). Hasil purifikasi Percoll virus ASF mempunyai nilai Ct lebih rendah dari pada hasil propagasi pada kultur sel primer leukosit. Menurut Carrascosa *et al.* (1985), purifikasi virus ASF menggunakan kesetimbangan sentrifus dalam gradien densitas Percoll mampu memulihkan $15 \pm 9\%$ partikel virus infeksius. Efikasi purifikasi virus ASF juga ditunjukkan dengan kemampuan mempertahankan daya infeksi setelah penyimpanan pada suhu -70°C selama 7 bulan.



Gambar 6. Deteksi virus ASF *strain* Indonesia/2022/Pig/PSJ hasil propagasi pada kultur sel primer leukosit babi dengan qPCR ASF gen *B646L* (p72). (A) Kontrol positif, Ct 23,99. (B) Organ limpa, Ct 25,24. (C) Purifikasi virus dengan Percoll, Ct 28,03. (D) Supernatan kultur sel primer leukosit babi, Ct 30,04. (E) Kontrol negatif.

Infeksi virus ASF menyebabkan *long-term* viremia pada babi yang terinfeksi, sehingga uji qPCR menjadi teknik yang sangat baik dan cepat yang dapat digunakan sebagai metode diagnostik rutin untuk ASF baik dalam program pengawasan, pengendalian, atau pemberantasan. Primer dan probe qPCR yang digunakan mengandung informasi virus ASF pada target gen *B646L* (p72) yang telah terkarakterisasi dengan baik dan sangat *conserved*. Secara khusus, qPCR ASF dengan target gen *B164L* (p72) merupakan rekomendasi WOAHA telah divalidasi untuk mengidentifikasi virus ASF dari 24 genotipe (Luo *et al.* 2017; Liu *et al.* 2019; Hwang *et al.* 2023).

Kesimpulan

Kultur sel primer leukosit babi untuk isolasi virus ASF berhasil dilakukan dengan karakteristik adanya reaksi hemadsorpsi (HAD) dan membentuk *rosette-like structure*. Reaksi hemadsorpsi (HAD) dapat diamati setelah 2 kali *blindpassage*. Purifikasi virus ASF menggunakan gradien Percoll dapat meningkatkan kemurnian virus yang ditandai dengan nilai Ct yang lebih rendah dibandingkan dengan supernatant hasil kultur sel primer leukosit babi.

Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini didukung oleh Rumah Program Pengembangan Alat dan Deteksi Kesehatan,

Organisasi Riset Kesehatan, Badan Riset dan Inovasi Nasional (No. 22/III.9/HK/2022) dan VETLAB Network (RAS5085), initiative of the Joint FAO/IAEA Division melalui African Renaissance and International Cooperation Fund of South Africa dan Peaceful Uses Initiatives (PUI) yang didanai oleh Jepang dan Amerika Serikat. atas dukungan dana selama menjalankan penelitian ini.

Daftar Pustaka

- Alonso, C., Borca, M., Dixon, L., Revilla, Y., Rodriguez, F., Escribano, J.M. and Report Consortium, I.C.T.V. (2018). ICTV virus taxonomy profile: Asfarviridae. *Journal of General Virology*. 99 (5): 613-614. doi:10.1099/jgv.0.001049
- Balyshev, V.M., Vlasov, M.E., Imatdinov, A.R., Titov, I., Morgunov, S.Y. and Malogolovkin, A.S. (2018). Biological properties and molecular-genetic characteristics of African Swine Fever virus isolated in various regions of Russia in 2016–2017. *Russian Agricultural Sciences*. 44:469-473. doi: 10.3103/S106836741805004X
- Cabezón, O., Muñoz-González, S., Colom-Cadena, A., Pérez Simó, M., Rosell, R., Lavín, S., Marco, I., Fraile, L., de la Riva, P.M., Rodríguez, F., *et al.* (2017). African swine fever virus infection in Classical swine fever subclinically infected wild boars. *BMC Veterinary Research*. 13: 227. doi:10.1186/s12917-0171150-0
- Carrascosa, A.L., del Val, M., Santarén, J.F. and Viñuela, E. (1985). Purification and properties of African swine fever virus. *Journal of Virology*. 54 (2): 337–344. doi: 10.1128/jvi.54.2.337-344.1985
- Carrascosa, A.L., Bustos, M.J. and Leon, P.D. (2011). Methods for growing and titrating African swine fever virus: field and laboratory samples. *Current Protocols in cell biology*. 53 (1): 26-14. doi:10.1002/0471143030.cb2614s53
- Couacy-Hymann, E., Kouakou, K.V., Achenbach, J.E., Kouadio, L., Koffi, Y.M., Godji, H.P., Adjé, K.E., Oulaï, J., Pell-Minhiaud, H.J. and Lamien, C.E. (2019). Re-emergence of genotype I of African swine fever Virus in Ivory Coast. *Transboundary and emerging diseases*. 66 (2): 882-896. doi: 10.1111/tbed.13098
- Dharmayanti, N.L.P.I., Sendow, I., Ratnawati, A., Settypalli, T.B., Saepulloh, M., Dundon, W.G., Nuradji, H., Naletoski, I., Cattoli, G. and Lamien, C.E. (2021). African swine fever in North Sumatra and West Java provinces in 2019 and 2020, Indonesia. *Transboundary and emerging diseases*. 68: 2890–2896. doi:10.1111/tbed.14070
- Dixon, L.K., Sun, H. and Roberts, H.J.A.R. (2019). African swine fever. *Antiviral research*. 65: 34-41. doi:10.1016/j.antiviral.2019.02.018
- Droesbeke, B., Balmelle, N., Cay, A.B., Han, S., Oh, D., Nauwynck, H.J. and Tignon, M. (2024). Replication Kinetics and Infectivity of African Swine Fever Virus (ASFV) Variants with Different Genotypes or Levels of Virulence in Cell Culture Models of Primary Porcine Macrophages. *Microbiology research*. 15 (3): 1690-1708. doi: 10.3390/microbiolres15030112
- Gaudreault, N.N., Madden, D.W., Wilson, W.C., Trujillo, J.D. and Richt, J.A. (2020). African Swine Fever Virus: An Emerging DNA Arbovirus. *Frontiers in veterinary science*. 7: 215. doi: 10.3389/fvets.2020.00215
- Hwang, H.J., Choi, Y.S., Song, K., Frant, M. and Kim, J.H. (2023). Development and validation of a fast quantitative real-time PCR assay for the detection of African swine fever virus. *Frontiers in veterinary science*. 9: 1037728 doi: 10.3389/fvets.2022.1037728
- Kameyama, K.I., Kitamura, T., Okadera, K., Ikezawa, M., Masujin, K. and Kokuho, T. (2022). Usability of Immortalized Porcine Kidney Macrophage Cultures for the Isolation of ASFV without Affecting Virulence. *Viruses*. 14 (8): 1794. doi: 10.3390/v14081794

- King, D.P., Reid, S.M., Hutchings, G.H., Grierson, S.S., Wilkinson, P.J., Dixon, L.K., Bastos, A.D.S. and Drew, T.W. (2003). Development of a TaqMan® PCR assay with internal amplification control for the detection of African swine fever virus. *Journal of virological methods*. 107 (1): 53-61. doi: 10.1016/S01660934(02)00189-1
- Lee, S.C., Kim, Y., Cha, J.W., Chathuranga, K., Dodantenna, N., Kwon, H.I., Kim, M.H., Jheong, W., Yoon, I.J., Lee, J.Y., *et al.* (2024). CA-CAS-01-A: A permissive cell line for isolation and live attenuated vaccine development against African swine fever virus. *Microbiology research*. 62 (2): 125-134. doi:10.1007/s1227502400116-1
- León, P., Bustos, M.J. and Carrascosa, A.L. (2013). Laboratory methods to study African swine fever virus. *Virus research*. 173 (1): 168–179. doi: 10.1016/j.virusres.2012.09.013
- Liu, Q., Ma, B., Qian, N., Zhang, F., Tan, X., Lei, J. and Xiang, Y. (2019). Structure of the African swine fever virus major capsid protein p72. *Cell research*. 29 (11): 953-955. doi: 10.1038/s41422-019-0232-x
- Li, Z., Chen, W., Qiu, Z., Li, Y., Fan, J., Wu, K., Li, X., Zhao, M., Ding, H., Fan, S., *et al.* (2022). African Swine Fever Virus: A Review. *Life*. 12 (8): 1255. doi: 10.3390/life1208125
- Luo, Y., Atim, S.A., Shao, L., Ayebazibwe, C., Sun, Y., Liu, Y., Ji, S., Meng, X.Y., Li, S., Li, Y., *et al.* (2017). Development of an updated PCR assay for detection of African swine fever virus. *Archives of virology*. 162: 191–199 doi: 10.1007/s00705-016-3069-3
- Malmquist, W.A. and Hay, D. (1960). Hemadsorption and cytopathic effect produced by African swine fever virus in swine bone marrow and buffy coat cultures. *American journal of veterinary research*. 21: 104–108.
- Mazloun, A., van Schalkwyk, A., Shotin, A., Igolkin, A., Shevchenko, I., Gruzdev, K.N. and Vlasova, N. (2021). Comparative analysis of full genome sequences of African swine fever virus isolates taken from wild boars in Russia in 2019. *Pathogens*. 10 (5): 521 doi: 10.3390/pathogens10050521
- Mazur-Panasiuk, N. and Woźniakowski, G. (2019). The unique genetic variation within the O174L gene of Polish strains of African swine fever virus facilitates tracking virus origin. *Archives of virol.* 164 (6): 1667-1672. doi: 10.1007/s00705-019-04224-x
- Meloni, D., Franzoni, G. and Oggiano, A. (2022). Cell Lines for the Development of African Swine Fever Virus Vaccine Candidates: An Update. *Vaccines*. 10 (5): 707. doi: 10.3390/vaccines10050707
- Monteagudo, P.L., Lacasta, A., Lopez, E., Bosch, L., Collado, J., Pina-Pedrero, S., Correa-Fiz, F., Accensi, F., Navas, M.J., Vidal, E., *et al.* (2017). BA71ΔCD2: A New Recombinant Live Attenuated African Swine Fever Virus with Cross-Protective Capabilities. *Journal of virology*. 91 (21): e01058-17. doi:10.1128/jvi.01058-17
- Nguyen-Thi, T., Pham-Thi-Ngoc, L., Nguyen-Ngoc, Q., Dang-Xuan, S., Lee, H.S., Nguyen-Viet, H., Padungtod, P., Nguyen-Thu, T., Nguyen-Thi, T., Tran-Cong, T., *et al.* (2021). An assessment of the Economic Impacts of the 2019 African swine fever Outbreaks in Vietnam. *Frontiers in veterinary science*. 8: 686038. doi: 10.3389/fvets.2021.686038
- Olesen, A.S., Rasmussen, T.B., Nielsen, S.S., Boklund, A., Ploegaert, T., Moonen-Leusen, B., Blome, S., Belsham, G.J. and Bøtner, A. (2022). A multi-laboratory comparison of methods for detection and quantification of African swine fever virus. *Pathogens*. 11 (3): 325. doi: 10.3390/pathogens11030325
- Patil, S.S., Suresh, K.P., Vashist, V., Prajapati, A., Pattnaik, B. and Roy, P. (2020). African swine fever: A permanent threat to Indian pigs. *Veterinary world*. 13 (10): 2275. doi:10.14202/vetworld.2020.2275-2285

- Petrovan, V., Rathakrishnan, A., Islam, M., Goatley, L.C., Moffat, K., Sanchez-Cordon, P.J., Reis, A.L. and Dixon, L.K. (2022). Role of African swine fever virus proteins EP153R and EP402R in reducing viral persistence in blood and virulence in pigs infected with BeninΔDP148R. *Journal of virology*. 96 (1): e01340-21. doi: 10.1128/JVI.01340-21
- Puzankova, O., Gavrilova, V., Chernyshev, R., Kolbin, I., Igolkin, A., Sprygin, A., Chvala, I. and Mazloun, A. (2023). Novel protocol for the preparation of porcine bone marrow primary cell culture for African swine fever virus isolation. *Methods and protocols*. 6 (5): 73. doi: 10.3390/mps6050073
- Qiu, Z., Li, Z., Yan, Q., Li, Y., Xiong, W., Wu, K., Li, X., Fan, S., Zhao, M., Ding, H., *et al.* (2021). Development of Diagnostic Tests Provides Technical Support for the Control of African Swine Fever *Vaccines*. 9 (4): 343. doi: 10.3390/vaccines9040343
- Sánchez, E.G., Riera, E., Nogal, M., Gallardo, C., Fernández, P., Bello-Morales, R., López-Guerrero, J.A., Chitko-McKown, C.G., Richt, J.A. and Revilla, Y. (2017). Phenotyping and susceptibility of established porcine cells lines to African Swine Fever Virus infection and viral production. *Science reports*. 7(1): 10369. doi: 10.1038/s41598-017-09948-x
- Sanchez-Vizcano, J.M., Mur, L., Gomez-Villamandos, J.C. and Carrasco, J.L. (2015). An update on the epidemiology and pathology of African swine fever. *Journal of comparative pathology*. 152 (1): 9-21. doi: 10.1016/j.jcpa.2014.09.003
- Urbano, A.C. and Ferreira, F. (2022). African swine fever control and prevention: an update on vaccine development. *Emerging microbes and infections*. 11(1): 2021-2033. doi:10.1080/22221751.2022.2108342.
- Wang, Y., Kang, W., Yang, W., Zhang, J., Li, D., and Zheng, H. (2021). Structure of African swine fever virus and associated molecular mechanisms underlying infection and immunosuppression: a review. *Frontiers in immunology*. 12: 715582. doi: 10.3389/fimmu.2021.715582
- [WOAH] World Organization for Animal Health. (2021). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals; Chapter 3.8.1—African Swine Fever (Infection with African Swine Fever Virus); OIE: Paris, France https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.08.01_ASF.pdf
- Yoo, D., Kim, H., Lee, J.Y. and Yoo, H.S. (2020). African swine fever: Etiology, epidemiological status in Korea, and perspective on control. *Journal of veterinary sciences*. 21(2):e38. doi: 10.4142/jvs.2020.21.e38
- Zhao, D., Liu, R., Zhang, X., Li, F., Wang, J., Zhang, J., Liu, X., Wang, L., Zhang, J., Wu, X., *et al.* (2019). Replication and virulence in pigs of the first African swine fever virus isolated in China. *Emerging microbes and infections*. 8(1): 438-447. doi: 10.1080/22221751.2019.1590128
- Zhu, Z., Mao, R., Liu, B., Liu, H., Shi, Z., Zhang, K., Liu, H., Zhang, D., Liu, J., Zhao, Z., *et al.* (2024). Single cell profiling of African swine fever virus disease in the pig spleen reveals viral and host dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 121(10): e2312150121. doi: 10.1073/pnas.2312150121