

非洲猪瘟研究：

哪些已知？哪些未知？

作者：全球非洲猪瘟研究联盟

译者：郝飞、谢星、王佳、华利忠

校稿：熊祺琰、于岩飞、陈蓉、张珍珍

主审：邵国青、冯志新

江苏省农业科学院兽医研究所

2018年11月

译文简介

1905 年英国引进家猪到肯尼亚殖民地，非洲猪瘟（ASF）追溯案例首发于 1907 年，1957 年走出非洲，2007 年格鲁吉亚野猪感染并向四面扩散，经过 100 年流行变异，2018 年全球 14 个国家爆发，中国成为最大受害者，疫情继续呈全球流行态势。

我国幅员辽阔，家养猪、软蜚资源丰富，为非洲猪瘟病毒进一步演化和变异提供了前所未有的条件，这不仅不断对国内外养猪产业造成极大损失，还危及大量优良地方品种猪和不同品种野猪的生存，危及国家粮食安全和生态环境保护。战胜非洲猪瘟须要知己知彼、兵草钱粮和大众参与，首先要检查我们自身是否尊重科学，发动群众，还要切实认识病原。本文转译自全球非洲猪瘟研究联盟（GARA）2018 年十月的总结更新，帮助同行了解非洲猪瘟哪些已知，哪些未知。十月完成的译稿瑕疵较多，特组织团队十多位博士重新审译。

感谢 John Carr 博士及时提供资料，原著属于直接针对非洲猪瘟的归纳综述，与防控相关的新的诊断技术、疫苗研发、防控方法和产品的展开有待专题讨论。由于水平有限，翻译仍有错漏，恳请同仁参阅原文学习并批评指正。

邵国青、冯志新 研究员、博导

gqshaonj@163.com

二零一八年十一月十六日

全球非洲猪瘟研究联盟（GARA）旨在扩大世界范围内 ASF 的研究合作，最大限度地利用专业资源，以实现其五大个战略目标：

- 1、成为全球 ASF 研究团体的交流平台，促进研究合作；
- 2、引导组织战略性研究，提升对 ASF 的认知；
- 3、研发下一代控制技术及其应用策略；
- 4、确定新改进的控制技术的社会经济影响；
- 5、提供疫区动物和动物产品安全贸易的政策依据。

GARA 和联盟工作网站：<http://www.ars.usda.gov/GARA>

ASF 已知未知分析报告 评估当前的科学知识和现有对策，以有效控制和减轻 ASF 的影响，帮助全球控制和净化。

该报告汇编了 GARA 在其合作伙伴支持下组织的四次学术研讨会。

引用：

英文：African Swine Fever (ASF): Gap Analysis Workshop Report. 2018. Agricultural Research Service, Washington, D.C. (URL : <http://www.ars.usda.gov/GARA>)。

中文：非洲猪瘟：已知未知分析报告，2018，华盛顿哥伦比亚特区农业研究局著，江苏省农业科学院兽医研究所译（URL：<http://www.piginfo.com>）。

目录

报告摘要.....	6
组织照片.....	8
词汇简写.....	10
引言.....	11
背景.....	12
GARA 已知未知分析报告	12
参考材料.....	12
威胁的定义.....	13
经济影响.....	13
流行病学.....	13
监测.....	13
生物安全.....	14
扑杀.....	14
疫苗.....	14
诊断.....	15
未知分析.....	16
病毒学.....	16
发病机制.....	23
免疫学.....	27
疫苗.....	32
诊断.....	35
流行病学.....	44
监测.....	47
野生猪和野猪.....	48
蜚.....	48
对策评估.....	49
设想.....	49
决策模型.....	50

疫苗.....	53
诊断.....	54
消毒剂.....	57
杀螨剂.....	57
药物.....	57
个人防护装备（PPE）.....	57
建议.....	58
研究.....	58
灾备.....	61
结 论.....	62
图.....	63
表 1: 2017-218 年 ASF 疫情.....	64
表 2: NCBI 收录的 ASF 全基因组序列信息摘要.....	66
表 3: ASF 实验性质疫苗.....	67
附录 1 应对措施工作组说明.....	68
附录 2 实验性质疫苗.....	70
附录 3 监测用诊断方法.....	72
附录 4 应对疫病暴发时的诊断方法.....	74
附录 5 监测用实验室诊断方法.....	76
附录 6 应对疾病爆发的实验诊断学.....	78
附录 7 作出贡献人员.....	80
附录 8 参考文献.....	84

报告摘要

全球非洲猪瘟研究联盟(GARA)于 2013 年至 2016 年组织了四次学术会议, 报告当前已知的未知的 ASF 专业知识和兽医防控措施, 旨在推进有效防控。

会议关键共识: 虽然 ASF 历史上一直局限于非洲大陆, 但该病在欧洲、美洲、欧亚大陆的传入风险加剧, 可对经济造成毁灭性打击。非洲猪瘟是影响家猪、野猪的最复杂的病毒病之一。软蜱是其生物储库和传播载体。非洲猪瘟病毒 (ASFV) 通常在各种非洲野猪和薮猪体内呈现潜伏感染。

目前, ASF 在撒哈拉以南非洲二十多个国家流行, 自 2007 年高加索地区暴发疫情以来, 又暴发了 16 起新疫情, 波及格鲁吉亚、亚美尼亚、阿塞拜疆、俄罗斯、波罗的海国家和东欧。2016 年, ASF 继续蔓延至与西欧接壤的国家。2018 年, 中国首次报道 ASF 在亚洲暴发的情况。这些国家和地区的疫情没有得到有效控制, 进而增加了 ASF 传入其他国家的风险。

由于多种宿主方面的因素和 ASFV 分离株毒力多样性的影响, ASF 在猪体内的初始表现多变且无法预测。病毒诱导机体发病、组织趋向性、宿主范围和诱导机体免疫应答的机制仍然不是很清楚。该病有急性、慢性等多种发病形式。强毒株感染引起的抗体反应感染后至少 7-14 天才达到检测水平, 这使得早期检测变得困难, 对于监测计划是一大挑战。

GARA 确定了以下重要对策, 但也发现了多个薄弱环节:

监测

监测是抵御疫病暴发的第一道防线。快速准确的检测会影响控制措施的实施时间, 进而影响疫病暴发的严重程度。由于 ASF 的流行病学和 ASFV 分离株毒力的多样性等多种因素的影响, ASFV 在像美国这样的无 ASF 国家的猪体内的初始表达将是变化的和不可预测的。毒株的毒力从低到高不等; 临床症状包括从无明显症状的持续性先天性感染到急性感染等不同表现。历史上至少实行过两个监测计划: (1) 基于临床症状报告的“综合征”监测计划; (2) 基于实验室的监测计划, 包括对风险群体的诊断测试。因走私被污染的饲料导致 ASF 暴发的最新案例迫切要求建立新的检测和确诊方法, 将其作为实验室监测计划的一部分, 用于检测食品、食品残渣和农产品加工产品中的 ASFV。

扑杀

扑杀是减少排毒和阻止非洲猪瘟病毒传播的主要对策。最低限度控制措施包括扑杀感染猪群、在已建立的控制区内进行监测和移动限制，同时对与感染猪群接触的猪群进行监测。也可以对接触过发病动物的猪群和邻近猪群进行扑杀。然而，这种控制方法已经产生了重大的财政压力，并且对成千上万只动物的扑杀也引起了动物伦理争议。

生物安全

农场生物安全是控制 ASF 传入和传播的关键措施。可通过限制猪、人、设备、日用品以及 ASF 的潜在生物或机械载体的移动来实现高效的生物安全。明确传染源和传播途径是实施有效生物安全体系的关键措施。然而，在实施减少疾病传播的措施后，ASFV 最可能的传播途径可能会发生变化。由于 ASFV 是一种虫媒病毒，因此生物安全体系应该涉及设施的清洁和消毒程序（包括对昆虫和害虫的控制），应当减少与作为病毒来源的动物之间的接触。运输用卡车、人员之间的接触以及提供服务的小货车可能同样有助于疾病在场之间的传播。

疫苗

目前没有商品化疫苗。事实上，从未研制成功过有效的 ASF 商品化疫苗。虽然没有明确的分型，但研究 ASF 的科学家们发现，用一种病毒分离株免疫的动物，随后暴露于另一种异源毒株下时，很难获得交叉保护。这是 ASF 学界和兽医当局在考虑通过疫苗接种策略来控制 and 根除 ASF 时需要解决的一个重要问题。

诊断

通常依靠临床症状来判定疑似非洲猪瘟感染，但临床症状可能是非特异性的，且难以与猪的其他传染病区分（比如猪瘟）。需要通过抗原检测试验（如 PCR）和特异性抗体血清学试验结合进行确诊。ELISA 是常用方法，然而 ELISA 确诊方法尚未实现商品化。

组织照片

1、第一届 GARA 科学会议，于 2013 年 4 月 6 日至 8 日在美国纽约梅岛动物疫病研究中心举行。



2、第二届 GARA 科学会议，于 2014 年 11 月 11 日至 14 日在南非比勒陀利亚农业研究委员会-安德斯波德兽医学院举行。



ARC-ONDERSTEPSPOORT VETERINARY INSTITUTE
LNR-ONDERSTEPSPOORT VEEARTSENYKUNDE-INSTITUUT

Private Bag / Privaatsak X05, Onderstepoort 0110, South Africa / Suid-Afrika
Tel: (012) 529-9111 • Fax: (012) 565-6573 (Int: + 27 12)
E-Mail: ovi-info@arc.agric.za • Web site: www.arc.agric.za

3、第三届 GARA 科学会议，于 2016 年 9 月 6 日至 8 日在法国普卢夫拉冈国家食品环境及劳动卫生署举行。



4、第四届 GARA 科学会议，于 2018 年 4 月 11 日至 13 日在意大利撒丁岛卡利亚里动物疫病预防实验室举行。



词汇简写

- AHT: 动物保健技师
- APHIS: 动植物卫生检验局
- ARS: 农业研究局
- BSL: 生物安全等级
- ELISA: 酶联免疫吸附试验
- ASF: 非洲猪瘟
- ASFV: 非洲猪瘟病毒
- DIVA: 区分感染和免疫的标记
- FADDL: 动物外来病诊断实验室
- GMP: 生产质量管理规范
- HSPD-9: 美国国土安全总统指令-九
- Ig: 免疫球蛋白
- MLV: 改良活病毒疫苗
- NAHLN: 国家动物卫生实验室网络
- NVS: 国家兽医储备
- OIE: 世界动物卫生组织
- PCR: 聚合酶链式反应.
- PPE: 个人防护装备
- RT-PCR: 逆转录聚合酶链式反应
- cRT-PCR: 常规 RT-PCR
- rRT-PCR: 实时逆转录聚合酶链式反应
- VMO: 兽医主任

引言

非洲猪瘟 (ASF) 是家猪的一种传染性病毒性疾病, 可导致严重的经济损失。在非洲, 非洲猪瘟病毒 (ASFV) 在两种野生动物中产生隐性感染: 疣猪 (荒漠疣猪) 和薮猪 (非洲野猪)。软蜱 (毛白钝缘蜱) 是 ASFV 的储存宿主 (Dixon 等, 2005)。

非洲猪瘟病毒是一种大型囊膜病毒, 含有大约 190 kb 的双链 DNA。非洲猪瘟病毒基因组结构和复制策略与其他大的双链 DNA 病毒类似 (包括痘病毒科, 虹彩病毒科和藻类病毒科病毒)。虽然 ASFV 最初基于病毒粒子形态被归类为虹彩病毒, 但随着分子生物学知识的不断更新, 其被重新划分至新的 DNA 病毒家族: 非洲猪瘟病毒科 (*Asfar*, 非洲猪瘟和相关病毒)。ASFV 为该科唯一成员 (Costard 等, 2009)。

非洲猪瘟病毒在家猪体内的感染常常是致命的, 并且以发烧、出血、共济失调和严重精神沉郁为特征。然而, 感染的过程取决于宿主特性和特定毒株。非洲猪瘟有多种临床表现, 从高度致死型到亚临床感染。急性非洲猪瘟病例由高毒力毒株引起, 其特征是感染猪在感染后 3 至 7 天死亡。亚急性和慢性感染的特征是高烧、步态蹒跚、咳嗽、腹泻、皮肤发绀、感染后 20 至 45 天死亡。亚急性和慢性感染分别与中等毒力和低毒力非洲猪瘟毒株有关 (van Oirschot, 1999)。

非洲猪瘟曾被认为是伊比利亚半岛的一种地方性疾病, 除了撒丁岛以及最近 2007 年发生 ASF 疫情的高加索地区, 欧盟已于 20 世纪 90 年代末成功根除该病。虽然欧盟的大多数成员国成功地从家猪中消灭了这种疾病, 但是使用被进口带毒猪产品污染的泔水饲喂家猪使得 ASF 重新传入某个国家或扩散至家猪群的威胁持续存在 (Costard 等, 2009)。

在该病暴发地区尚未出现 ASF 疫情的国家目前采用封锁和主动扑杀。封锁和主动扑杀虽然有效, 但会造成巨大的经济损失 (Arias 和 Sanchez-Vizcaino, 2002)。目前没有针对 ASF 的疫苗。因此, 检测和扑杀感染动物是迄今为止控制/根除 ASF 的唯一方法 (Costard 等, 2009)。

背景

GARA 已知未知分析报告

该报告汇编了 2013 年-2018 年 GARA 组织的科学会议期间的未知分析报告：

(1) 第一届 GARA 科学会议，于 2013 年 4 月 6 日至 8 日在美国纽约梅岛动物疫病研究中心举行

(2) 第二届 GARA 科学会议，于 2014 年 11 月 10 日至 14 日在南非比勒陀利亚农业研究委员会安德斯波德兽医学院举行

(3) 第三届 GARA 科学会议，于 2016 年 9 月 6 日至 8 日在法国普卢夫拉冈国家食品环境及劳动卫生署举行

(4) 第四届 GARA 科学会议，于 2018 年 4 月 11 日至 13 日在意大利撒丁岛卡利亚里动物疫病预防实验室举行

ASF 专家进行的该未知分析根据来自 34 个不同国家的 44 个研究机构的研究进展和科学文献综述进行的。ASFV 研究的优先领域正是利用这些信息确定的。

参考材料

GARA 推荐以下网站和报告作为 ASF 生物学、流行病学和疫病防控的背景信息：

1. <https://www.ars.usda.gov/GARA/> (GARA 官网)
2. <http://www.fao.org/docrep/004/y0510e/y0510e00.HTM> (FAO: ASF 应急预案)
3. <http://www.oie.int/wahis/public.php?page=disease> (世界动物卫生信息数据库 (WHIS))
4. <http://athena.bioc.uvic.ca/organisms/Asfarviridae> (病毒生物信息学：非洲猪瘟病毒科)
5. <http://www.fao.org/3/a-i7228e.pdf> (FAO 手册：发现与诊断)
6. <http://www.fao.org/ag/againfo/programmes/en/empres/ASF/index.html> (ASF 资源)

威胁的定义

非洲猪瘟 (ASF) 传入新的地理位置的威胁从未像现在这样严峻。自 2007 年 ASF 传入格鲁吉亚共和国以来, 已有 16 个非洲以外的国家报告了 ASF 疫情 (表 1)。随着 ASF 在非洲、俄罗斯、欧洲以及现在中国的不断蔓延, 先前无 ASF 的国家传入 ASF 的威胁持续存在。潜在的感染途径包括: (1) 利用被进口带毒猪产品污染的泔水饲喂家猪 (2) 病毒从感染的野生猪、野猪或其他野生猪科动物传播到新地理区域 (3) 意外或恐怖袭击。

经济影响

ASF 传入非洲以外的国家对养猪业产生了重要的经济影响。ASF 传入导致的严重后果是国际贸易地位的丧失以及为根除疾病而实施的严厉而昂贵的控制策略 (Costard 等, 2009)。古巴在 1980 年暴发该病后导致的经济损失高达 940 万美元 (Simeon-Negrin 和 Frias-Lepoureau, 2002 年)。西班牙实施根除计划最后 5 年的耗资高达 9200 万美元 (Arias 和 Sanchez-Vizcaino, 2002 年)。鉴于对猪肉生产和贸易的影响以及根除成本, Rendleman 和 Spinelli 在 1994 年估计, 预防 ASF 传入美国带来的纯收益将近 4.5 亿美元, 几乎占猪肉产品销售额的 5%。

流行病学

由于风险因素的不同, 非洲猪瘟可能表现出不同的区域呈现模式, 应该建立相关评估体系以及制定适当的监测和控制策略。ASF 流行病学的变化取决于猪群中的两种传播循环 (家猪循环和丛林传播循环)。由于宿主因素和 ASF 不同病毒株之间毒力的多样性, ASF 在先前无 ASF 的国家中的初始表达形式将是可变且不可预测的。另外, 节肢动物媒介的存在将影响病毒在环境中的维持。

监测

监测是通过早期检测从源头消除疾病以及控制疾病暴发的最重要的策略。然而, 需要不同的监测方案来检测由 ASFV 感染引起的不同临床表现。对于急性感

染而言，监测活动可以基于临床症状；然而，对于轻度病例或慢性感染，由 ASF 症状识别的可能性较小，必须开展基于诊断检测的监测活动，以作为基于临床症状监测的补充。被动监视通常是许多国家经济上唯一可行的方案，但由于难以区分 ASF 与许多常见的地方传染病，因此该方式存在许多弱点。主动监测项目是昂贵的，而且由于抗体检测方法尚不完善，目前必须依赖直接检测病原的方法，如病毒分离和核酸检测。

生物安全

在农场实施生物安全措施是预防和保护商品猪的最重要策略之一，但也需要专门制定具体的措施，并将其纳入根除计划，以防止通过运输和人与人之间的接触导致进一步传播和地区扩散。生物安全计划的主要目标是降低感染的可能性。应制定一套园区卫生措施，以实现生物安全计划确定的目标。实施的措施越多，成本就越高，但在疾病暴发的背景下这些都是必要的。

扑杀

扑杀是减少排毒和阻止非洲猪瘟病毒传播的主要对策。最低限度的控制措施包括扑杀感染猪群，在已建立的控制区内进行监测和移动限制，同时对与受感染猪群接触的猪群进行监测。也可以对接触过发病动物的猪群和邻近猪群进行扑杀。然而，这种控制方法已经产生了重大的财政压力，并且对成千上万只动物的扑杀也引起了动物伦理争议。感染畜群的扑杀速度，包括处理尸体和圈舍消毒可能对疾病传播、暴发持续时间和控制措施的整体有效性产生影响(Boklund 等, 2009)。这种控制措施对于在明确圈定的场所或猪场养猪的国家或地区有效。在实行散养的地区，扑杀的执行可能很困难。

疫苗

ASF 没有可用的疫苗，对该病的控制严格依赖于动物检疫、生物安全措施和扑杀。这反映出目前有效预防、控制或根除 ASF 的兽医医疗对策不完善，与 ASF 暴发的现实需求相比还存在相当的差距。研发疫苗面临一些挑战，包括以下技术障碍：(1) ASFV 是已知的最大 DNA 病毒之一，其大多数病毒基因尚未鉴

定或确定功能；（2）没有可以用于疫苗生产的可供病毒增殖的细胞系；（3）具有多个不同表型特征的 ASFV 基因型，在迄今为止实验疫苗测试中几乎没有或没有交叉保护；（4）研制的疫苗既要可用于家猪注射免疫，同时在丛林传播循环的情况下，也要能够对野生猪、野猪以及潜在的其他野生猪科动物进行口服免疫。

诊断

通常依靠临床症状来判定疑似非洲猪瘟感染，但临床症状可能是非特异性的，且难以与猪的其他传染病区分。与 ELISA 抗体检测同时使用的实时和常规 RT-PCR 是用于区分 ASF 感染的重要工具。利用血清学和病原学区分引起 ASF 样疾病的其他病因是关键。如果必须要检测大量样品，商品化的 ELISA 检测试剂盒将特别实用。另外，也需要有可用于疫情暴发时的现场检测方法，以便在现场根据检测结果迅速做出决定。

未知分析

以下部分概述了关于非洲猪瘟我们所知道的情况、我们目前知识的局限性以及研究需求。

病毒学

非洲猪瘟病毒 (ASFV) 是一种含有约 190 kb 双链 (ds) DNA 的大型囊膜病毒。ASFV 编码一些独特的基因用于调节宿主免疫应答、对家猪的毒力以及在昆虫载体中复制和传播。ASFV 与其他大型双链 DNA 病毒有着近似的基因组结构和复制策略,包括痘病毒科、虹彩病毒科和藻类病毒科(Dixon 等, 2000 和 2008)。ASFV 和痘病毒在已感染细胞的细胞质中复制,具体主要在被称为病毒工厂的离散核周进行组装。它们都拥有基因表达的时序调节和相似的基因组结构,包括末端反向重复、末端交联、中心保守区和基因组每个末端的可变区的(van Oirschot, 1999)。虽然最初主要基于病毒粒子形态将 ASFV 归类为虹彩病毒科,但随着分子生物学知识的不断更新,人们将其重新划分至一新的 DNA 病毒家族:非洲猪瘟病毒科(Asfar, 非洲猪瘟和相关病毒), ASFV 为该科的唯一成员(Costard 等, 2009)。

电子显微镜观察结果表明, ASFV 具有复杂但规则的结构,其病毒粒子由 50 多种多肽组成,呈二十面体对称结构,并且包含几个同心层,总直径约为 200 nm (Breese 和 DeBoer, 1966; Carrascosa 等, 1984 和 1985; Estevez 等, 1986 和 1987; Schloer, GM, 1985)。其 80 nm 大的病毒粒子核心由一类核结构组成(Andres 等, 1997 和 2002)。围绕类核的是两个脂质双分子层(Andres 等, 1997 和 1998; Rouiller 等, 1998)。内膜外部是衣壳,由包含约病毒粒子三分之一蛋白质成分的结构蛋白 p72 (也称为 p73) 组成,构成病毒的二十面体结构(Andres 等, 1997; Carrascosa 等, 1986; Garcia-Escudero 等, 1998; Tabares 等, 1980a)。覆盖衣壳的是通过质膜及其病毒粒子出芽获得的疏松外膜,且这不是病毒感染所必需的(Andres 等, 2001; Breese 和 DeBoer, 1966; Carrascosa 等, 1984; Moura Nunes 等, 1975 年)。

与已发现的痘病毒类似的是，ASFV 病毒粒子具有酶活性，有助于细胞质中病毒复制的早期事件和关键活动，包括 RNA 聚合酶、核苷三磷酸磷酸水解酶、拓扑异构酶、mRNA 加帽和蛋白激酶活性 (Kuznar 等, 1980 和 1981; Polatnick, 1974; Salas 等, 1981 和 1983)。

研究报道,非洲家养发病猪中分离的 ASFV 毒株以及在蜱中分离的毒株的基因组均存在异质性 (Dixon 和 Wilkinson, 1988; Sumption 等, 1990)。随后利用 p72 的部分基因开展的分子系统发育结果部分支持了这些观点,包括发现西非、欧洲、美洲分离株的基因呈现相对的同质性,某些在家养发病猪中分离来源于非洲谱系毒株的基因同质性,以及来自非洲南部和东部分离株之间的相对基因异质性 (Bastos 等, 2003; Lubisi 等, 2003; Wambura 等, 2006)。

然而, ASFV 蛋白在不同的分离株中相当保守。在不同病毒分离株中核心基因组相对保守。包括膜和病毒颗粒中的其他结构蛋白,以及最近被证明影响已感染细胞中不同阶段的病毒粒子形态的蛋白 (Afonso 等, 1992; Alcami 等, 1992 和 1993; Brookes 等, 1998b; Camacho 和 Viñuela 1991; Lopez-Otin 等, 1988 和 1990; Munoz 等, 1993; Rodriguez 等, 1994; Simon-Mateo 等, 1995; Sun 等, 1995 和 1996)。其他 ASFV 蛋白与细胞内的蛋白或酶具有序列相似性,包括那些涉及核苷酸代谢、DNA 复制和修复、转录和蛋白修饰方面的蛋白,以及那些可能与 ASFV 病毒粒子中存在或在受感染细胞中诱导的酶活性相关的蛋白或酶 (Baylis 等, 1992 和 1993a; Blasco 等, 1990; Bournnell 等, 1991; Freije 等, 1993; Hammond 等, 1992; Lu 等, 1993; Martin Hernandez 和 Tabares 1991; Martins 等, 1994; Rodriguez 等, 1993b; Yanez 1993; Yanez 等, 1993a, 1993b 和 1993c)。其中部分蛋白似乎与痘病毒中鉴定的同源物有很大关系 (Baylis 等, 1993b; Blasco 等, 1990; Bournnell 等, 1991; Freije 等, 1993; Martin Hernandez 和 Tabares 1991; Roberts 等, 1993; Yanez 等, 1993b)。ASFV 基因组中编码的其他酶组分包括细胞泛素结合酶、反式戊二烯基转移酶、NifS 样蛋白和碱基切除修复途径的组分同源物 (Hingamp 等, 1992; Rodriguez 等, 1992)。ASFV 还编码预测为介导病毒与宿主相互作用、毒力因子和增强病毒在宿主内成功复制的功能蛋白,其中包括细胞凋亡抑制因子 (IAP) 类似物、Bcl-2、I Kappa B (IKB) 骨髓分化初级应答抗原 MyD116、凝集素样和 CD2 蛋白 (Borca 等, 1994b; Neilan

等, 1993a; Rodriguez 等, 1993a; Sussman 等, 1992)。值得注意的是, 部分假定的毒力/宿主范围蛋白, 以及某些多基因家族 (MGF) 蛋白, 中心可变区蛋白 9-RL (即 BA71V 中注释的 pB602L) 和含有可变串联重复序列的结构蛋白 p54 (pE183L) (Irusta 等, 1996; Rodriguez 等, 1994; Sun 等, 1995), 均属于多个田间分离株中变异最大的。

最近, 一些报告有助于理解一些先前未被鉴定或仅部分被鉴定的病毒蛋白的作用。其中一些蛋白对于病毒复制至关重要, 如 E2 泛素结合酶 I215L (Freitas 等, 2018)、病毒脱帽酶 D250R 或 g5R (Quintas 等, 2017)、病毒组蛋白样蛋白 pA104R (Frouco 等, 2017)、凋亡诱导蛋白 A179L (Banjara 等, 2017)、病毒拓扑异构酶 II 蛋白 (Freitas 等, 2016) 以及除了先前被报道为病毒复制必不可少的, 与宿主蛋白 BAG6 (Borca 等, 2017) 的特异性结合功能外, 其余功能未知的病毒蛋白 Ep152R。

ASFV 的病毒复制过程在过去几年中也受到关注。除了上述病毒蛋白在其复制过程中发挥的必要性被揭示之外, 假定的细胞受体 CD163 在介导病毒在猪巨噬细胞培养物中的感染和猪体内复制中的重要性也得到一致认可。同时, 遗传编辑的 CD163 缺陷猪在对病毒感染的易感性方面与其正常对照猪没有差异, 并且对 ASFV 完全易感 (Popescu 等, 2017), 这清楚地表明这至少存在一种病毒进入易感细胞的替代途径。此外, 细胞囊泡系统以及泛素蛋白酶体系统已被证明在病毒复制过程中发挥至关重要的作用 (Cuesta Geijo 等, 2017; Barrado Gil 等, 2017)。



虽然只有一个病毒种类, 但是目前已有 24 个基因型; 然而, 这个分类是基于单个基因的测序。p54 基因的全基因组序列已被证实为分子流行病学研究中一种有价值的附加基因分型方法。通过分析 B602L-基因内的中心可变区(CVR)可进一步提高区分度, 因为此区域是近缘分离株之间变异最大的位点, 并可借此对目前 24 个基因型中的几个基因型进行亚群细分 (Gallardo 等, 2009)。显然, 在基因组大小、毒力和免疫原性 (没有交叉保护) 方面存在显著差异, 但对于有关毒力、宿主范围和病毒-载体-宿主相互作用的基因知之甚少。

缺乏 ASFV 基因组信息和 ASFV 易感物种的宿主基因组信息

另一个重要未知空白是缺乏 ASFV 基因组序列和 ASFV 易感物种的宿主基因组信息。目前, ASFV 分离株的全长基因组序列非常少, NCBI (National Center for Biotechnology Information) 仅有 19 条公开。这些毒株信息总结在表 2 中, 包括它们的上传日期, 来源地以及来自何种宿主。非常有限的序列数据中, 有 6 个毒株分离自蜚, 10 个来自家猪, 1 个来自疣猪, 1 个来自野猪。多样性序列信息的缺乏使不同分离株之间差异性也难以解释。目前 ASFV 分离株的可用全长基因组序列的主要空白如下:

- (1) 来自不同地区和宿主的分离株基因组信息 (包括家猪、野猪、疣猪和蜚)
- (2) 天然存在的或实验室衍生的致弱分离株基因组信息
- (3) 流行区域分离株基因组在时间和空间方面的进化演变信息
- (4) 非洲目前暴发的田间野毒株基因组信息

有趣的是, 在普卢弗拉冈出现了与爱沙尼亚相同的 ASFV 基因 II 型减毒表型株 (Zani 等, 2016)。这株病毒分离自无 ASF 临床症状, 但血清抗体阳性的康复期野猪。将重新分离的这株减毒病毒分别口服接种小型猪和家用育肥猪。这两个独立的试验虽然选择的猪品种不同, 但病毒感染均呈现减弱的表型, 这引起人们担心这些非特异性临床症状可能会使疾病控制复杂化, 并且这些减毒株可能正在爱沙尼亚野猪中正在循环。

易感宿主品系的基因组是 ASFV 研究中的另一个主要空白。虽然在 NCBI 上有来自野猪品种的 14 个独立的基因组信息, 但非洲和欧洲暴发地区的野猪、家猪、公猪和疣猪的基因组序列仍然未知。为了研究到底哪些因素导致上述某些猪品种出现抗性, 必须进行大规模的基因组测序工作。主要的未知空白包括地方性或疫情暴发地区的家猪和野猪的品系和亚种, 以及能够在疫情暴发中存活猪只的基因组序列。

尽管下一代测序的最新进展对 ASFV 及其宿主基因组的测序都有重要价值, 但问题依然存在。其中很大程度上是由于采样、测序以及建立这些大型基因组所

需的大量成本和工作量。就 ASFV 基因组测序而言，更好的方案是从宿主 DNA 中分离病毒 DNA，这将更有利于测序工作。没有这些信息，功能基因组研究仅限于每个独立实验室中的特定毒株和宿主应答。随着这些信息的逐渐公开，将有助于更好地预测分离株之间潜在的交叉保护以及病毒如何随着时间的推移以及在疫病暴发期间的进化。

ASFV 和不同感染阶段宿主的转录组学

ASFV 具有 150-170 个 ORF（开放阅读框），然而这些 ORF 中的大多数是预测的，并且很少有关于 RNA 或蛋白质水平的实验证据。尽管这些 ORF 中的大多数确实可能产生蛋白质产物，但这些病毒基因的表达谱可能因分离株而异，并且可能因感染病毒的宿主而异，这可以解释 ASFV 感染从 100%死亡到亚临床感染的不同结果。然而，迄今为止，即使在实验或体外水平，均没有关于 ASFV 表达基因的 RNA 或蛋白质谱的公开信息。

普卢弗拉冈 (Jaing 等, 2016) 提供了分别感染低致病性和高致病性 ASFV 的猪的全血 RNA 基因表达谱。RNAseq 分析鉴定了在感染高致病性 Georgia 2007 毒株的处死猪体中 395 个显著差异表达的基因，以及在感染减毒的 OURT88/3 毒株后第 7 天的 181 个修饰基因。两组中均显著变化的前 20 个共同基因分别是与巨噬细胞、自然杀伤细胞、趋化因子和其他重要免疫应答细胞相关的标记物基因。

在病毒使用何种受体感染猪巨噬细胞方面的研究仍是空白。许多分子在感染时充当受体和共同受体是可能的。候选基因之一，CD163，一种由成熟巨噬细胞表达的清道夫受体，被认为可能与能否被 ASFV 感染的允许性相关。然而，使用 CRISPR / Cas9 基因编辑的 CD163 突变体的猪表明发现缺乏 CD163 的重组猪仍然易感且没有观察到病毒毒力的变化，表明 CD163 不是 ASFV 的受体 (Popescu 等, 2017)。已有报道，几种不同的 ASFV 分离株可在从野猪中分离的稳定细胞系 (WSL) 上适应生长，在分析这些病毒基因组全长序列时，没有检测到基因组中出现大的缺失，因此 WSL 可用作病毒培养 (Keil 等, 2016)。

这些新的报道增加了我们对其感染机制的了解，并将有助于了解病毒诱导的免疫和鉴定新的疫苗候选基因。然而，需要新的实验数据来充分阐明和理解病毒

如何在细胞水平上与宿主进行相互作用。

需要填补的主要空白之一是 ASFV 感染的宿主细胞的全局表达谱尚未完全确定。该信息可用于确定宿主如何响应病毒感染，以及在病毒感染期间打开或关闭了哪些分子途径。这些类型的实验可用于比较宿主细胞对不同毒株的应答，例如将减毒的 ASFV 毒株与亲本毒株进行比较。该信息可以更好地对自然发生的或实验室产生的 ASFV 减毒分离株有所了解。了解这些信息将有助于了解这些病毒是如何减毒的。一旦在细胞水平上理解宿主细胞的应答反应，也可以收集这些信息并将其应用于宿主中的应答反应。

增加对 ASFV 和 ASFV 感染宿主的转录组学知识将更好地理解 ASFV 的毒株变异性，以及病毒分离株和不同宿主之间的免疫应答。

ASFV 蛋白的功能基因组学

大多数 ASFV 蛋白功能均尚未被证实，功能基因组学还主要仅对病毒的保守蛋白质序列或其他病毒家族以及宿主蛋白中的结构域进行预测。而经过实验验证蛋白功能是 ASF 研究的一个主要未知空白。了解 ASFV 蛋白在感染过程中的作用不仅对于理解 ASF 的发病机制，同时也对理解 ASFV 如何躲避宿主免疫系统的检测并引起宿主发病的机制至关重要。了解任何特定 ASFV 蛋白的功能不应停止在功能预测中，鉴定 ASFV 和宿主的特定蛋白质及其配体是 ASFV 研究中的主要缺陷。迄今为止，关于宿主与病毒蛋白质互作的报道非常少。

一些相关的最新信息在法国 Ploufragan 的 GARA Gap 分析研讨会上发布，如验证了先前未鉴定的 ASFV Ep152R 的基因功能及其与细胞蛋白 Bag6 的相互作用 (Borca 等, 2016)。此外，还报道了通过胞吞作用在病毒进入时病毒脱壳的机制以及与该过程相关的一些细胞分子的鉴定 (Cuesta-Geijo 等, 2016)。另外，他们报道了一种与先天免疫相关的干扰素诱导蛋白 (IFITM 蛋白) 能够抑制病毒从内体进入细胞质的作用 (Muñoz-Moreno 等, 2016)。不仅如此，有报道称可通过质谱分析用于 ASFV 病毒颗粒纯化和细胞外成熟的 ASF 病毒粒子蛋白质组特征鉴定。研讨会还报道，ASFV 病毒和宿主新的互作结构蛋白也已鉴定 (Kessler 等, 2016)。

清楚地了解 ASFV 蛋白的功能及其在感染过程中的作用，特别是 ASFV 如何逃避免疫反应，对于合理设计减毒活疫苗的开发至关重要。大规模功能基因组研究是未知空白研究的重要部分，可以通过直接蛋白质-蛋白质互作的鉴定方法，如酵母双杂交或免疫共沉淀（Co-IP），然后进行结合质谱分析。病毒蛋白的纯化和体外测定试验用来对于确认它们的功能被预测作用将具有额外的价值。

通过宿主基因组筛选确定 ASFV 的毒力因子

鉴于今天的技术，其他许多病毒已经完成了大规模的基因组筛选，迄今为止还没有报道 ASFV 的这种筛选，表明了 ASFV 研究中存在巨大未知。这些基因组筛选需要猪特异性试剂，例如通过 siRNA 筛选或 CRISPR/Cas9 筛选一个针对猪基因组的文库。这些猪特异性文库的开发对于 ASFV 可靠的大规模体外基因组筛选是必需的。这些筛选将有助于深入了解对 ASFV 复制至关重要的宿主途径，并可能导致发现病毒细胞受体，感染的免疫标记以及病毒复制和病毒毒力所涉及的通路。该信息将有助于理解病毒细胞嗜性，从而有助于开发利于病毒复制的细胞系以及加深对病毒发病机理的理解。



(1) ASFV 基因组序列：

利用目前的 DNA 测序技术，对以下的毒株进行完整基因组测序是比较容易和便宜的：1) 各基因型毒株 1-3 株；2) 具有不同毒力的一系列病毒 (> 10 株)；3) 仅在家猪，野猪和昆虫中复制的一系列病毒 (> 5 株)。

(2) ASFV 生物信息学资源：

对 ASFV 基因组大小范围的基因组注释和分析较为困难，需要专门的工具。获得更多基因组序列将使基因补充的管理和比对更加复杂。尽管 ASFV 已有大量可用的测序数据，使用当前非常强大的技术，建立一个综合的数据库将非常有价值，该数据库将包括大量分离株的全基因组序列，以取代目前不太有意义的基于基因型的分类方法。

发病机制

ASF 在家猪体内的临床表现取决于流行毒株的毒力。ASFV 感染家猪导致几种形式的疾病，受病毒和宿主因素的影响，可呈现从高致死性急性表现到亚临床表现（Tulman 等，2009）。与家养猪不同，感染 ASFV 的野猪通常无症状且病毒血症滴度低（Heuschele 和 Coggins, 1969; Montgomery, 1921; Plowright, 1981; Thomson, 1985）。ASF 呈现的这些特征与其他猪病（例如丹毒和猪瘟）的临床表现存在相似性，因此对 ASF 的监测不可仅基于临床症状。

感染通常通过口鼻途径发生，其中原发病毒在扁桃体中复制，随后是在淋巴系统的所有器官进一步二次复制导致病毒血症。在该疾病呈急性发病形式时，病毒潜伏期为 5 至 15 天。感染的动物表现出发烧和厌食，其次是皮肤充血和发绀、呼吸和心率增加、流鼻涕、肢体不协调、呕吐、最后是昏迷和死亡。感染非洲猪瘟病毒的动物的存活时间为 2 至 9 天（Conceicao 1949; Creig 和 Plowright 1970; Haresnape 等，1988; Mendes 1961; Thomson 等，1979）。急性 ASF 的典型病理学症状包括白细胞减少症（Detray 和 Scott 1957; Edwards 等，1985; Wardley 和 Wilkinson, 1977），B 和 T 淋巴细胞减少症（Sánchez Vizcaino 等，1981; Wardley 和 Wilkinson, 1980），血小板减少症（Anderson 等，1987; Edwards 1983; Edwards 等，1985），淋巴细胞和单核细胞凋亡（Carrasco 等，1996; Gomez-Villamandos 等，1995; Oura 等，1998c; Ramiro-Ibañez 等，1996; Salguero 等，2004），淋巴结、脾脏、肾脏、呼吸道和胃肠道出血，皮肤和浆膜充血，以及严重的小叶间肺水肿（DeKock 等，1994; Detray 1963; Konno 等，1972; Manso Ribeiro 和 Rosa Azevedo, 1961; Maurer 等，1958; Montgomery, 1921; Nunes Petisca, 1965; Steyn, 1928 和 1932）。受影响组织的广泛坏死以及严重的出血和血液动力学变化可能是导致死亡的重要因素。急性 ASF 还诱导急性期蛋白质的显著变化（Carpintero 等，2007; Sanchez-Cordon 等，2007）。亚急性 ASF 感染持续 3-4 周，最显著的体征包括弛张热症、身体虚弱、肺炎、呼吸困难、心功能不全和关节肿胀。虽然淋巴结和其他组织的出血也可能发生，但并不像急性 ASF 那样明显（Moulton 和 Coggins, 1968a）。ASFV 感染的主要靶细胞类型是单核-吞噬系统的细胞，包括特定组织巨噬细胞和网状细胞的特定谱系（Colgrove 等，1969;

Konno 等, 1971a 和 1971b; Mebus 1988; Moulton 和 Coggins, 1968a)。被高毒力的毒株感染后, 受影响的组织显示出广泛的损伤。中等毒力 ASFV 毒株也感染这些细胞类型, 但组织受牵连的程度和由此导致的组织损伤严重程度要小得多。ASFV 在体内能够在巨噬细胞中复制并有效诱导显著的细胞病理学变化可能是 ASFV 发挥毒力的关键因素。

使用减毒的基因 I 型分离株感染猪后存在长期持续性感染已经被证实 (Wilkinson 1984; Carrillo 等, 1994)。并且已经证实低毒力基因 I 型 NH / P68 分离株可以从持续感染的猪群传播到直接接触的健康猪群 (Gallardo 等, 2015)。低毒力分离株可引起慢性疾病, 其特点是无血管病变, 死亡率低。然而生长迟缓、消瘦、关节肿胀、皮肤溃疡和继发细菌感染等症状很常见 (Sanchez-Vizcano 2015)。感染后存活猪的组织或血液中可长期携带病毒, 推测这可能会导致病毒传播、疾病持续存在、散在暴发和疫病的突然再复发 (Penrith 和 Vosloo, 2009; Costard 等 2013; Gallardo 等, 2015)。非洲的一些研究已经在表观健康的猪体内鉴定出 ASFV 核酸 (Kalenzi Atuhaire 等, 2013; Thomas 等, 2016), 其在组织中通过 PCR 检测为 ASFV 阳性, 但血液的 PCR 和血清学检测呈阴性 (Okoth 等, 2013; Abworo 等, 2017)。虽然持续感染的猪只与 ASFV 活病毒携带者的相关性尚不清楚, 持续感染猪只将病毒传播到阴性动物的实验证据也十分有限, 但健康动物受感染的数量不断累加 (Titov 等, 2017; Abworo 等, 2017; Thomas 等, 2016; Muhangi 等, 2015; Braae 等, 2015; Athuaire 等, 2013), 暗示着 ASFV 强毒株可以在康复的猪体内存活很长一段时间, 且后续可能会发生毒力的复发 (Titov 等, 2017)。

据报道在发生急性 ASFV 病毒感染而幸存的疣猪和家猪体内可出现 ASFV 的持续感染 (DeKock 等, 1940; Detray 1957; Plowright 等, 1969)。在实验感染条件下, 长期持续性感染同样是 ASFV (E75-L7 低剂量免疫, 即使用 E75-L7 对 E75-CV1 进行两次攻毒, 并使用 E75-L7 对 E75-CV1 进行一次攻毒) 在家猪体内感染的后遗症 (Carrillo 等, 1994)。在这些动物感染接种后超过 500 天的间歇期, 通过 PCR 仍可在部分外周血单核细胞中检测到病毒 DNA; 然而却不能从这些样品中分离出感染性病毒, 也从未证实这些病毒具有传播能力。在近期较短时间内, 根据多株不同基因型的中等毒力分离株的感染数据, 其结果与许多其他报告一致 (McVicar 1984; Mebus 和 Dardiri, 1980; Carrillo 等, 1994; Gallardo 等, 2015;

Carvalho Ferreira 等, 2012), 尽管对血液中的病毒基因检测长期为阳性(接种后至少 90 天), 但也不支持在感染后存活的动物中存在活病毒携带这一观点(Petrov 等, 2018)。

在撒哈拉以南非洲地区, ASFV 维持在野猪(疣猪和薮猪)和非洲钝缘蜱之间的丛林传播循环中(Plowright 等, 1969a 和 1969b; Thomson 等, 1983; Wilkinson 1989)。与家猪不同, 感染 ASFV 的野猪通常临床无症状且表现为低病毒血症(Heuschele 和 Coggins, 1969; Montgomery, 1921; Plowright, 1981; Thomson, 1985)。ASFV 地方性流行区的大多数成年疣猪都是血清学阳性, 这些阳性猪都可能存在持续感染。与疣猪一样, 薮猪也表现出亚临床感染, 且比家猪对直接接触传播更具有抗性; 然而, ASFV 病毒血症的持续时间则可能会延长(Anderson 等, 1998)。尽管 ASFV 在家猪、疣猪和薮猪体外的外周血白细胞中的复制相似, 但 ASFV 在薮猪体内的复制、传播和诱导淋巴细胞凋亡的能力低于家养猪(Anderson 等, 1998; Oura 等, 1998a 和 1998b)。

ASFV 的部分基因在病毒毒力中的作用已有一些报道。越来越明显的是末端基因组区域和多基因家族(MGF)基因在 ASFV 感染宿主细胞能力中起重要作用。与其他大型 DNA 病毒类似, 涉及感染宿主巨噬细胞能力的是参与核苷酸和核酸代谢的 ASFV 蛋白, 这些蛋白为特定细胞类型病毒的有效复制可能提供了有利的脱氧核苷酸库。从 ASFV 中缺失 dUTPase(E165R 基因)和胸苷激酶(K196R 基因)基因降低了其在猪巨噬细胞中复制的能力并减弱了猪体内的病毒, 也再次将感染宿主巨噬细胞能力与在猪体内毒力呈现相关联(Moore 等, 1998)。

另外, 一些 ASFV 基因或基因区域与病毒在家猪体内的致病性和毒力相关, 但与病毒在体外巨噬细胞中的复制无关。其中 UK(DP96R)和 23-NL(DP71L 或 114L)两个基因相邻位于基因组中。UK 是一种早期蛋白质, 与其他已知蛋白不同的是, 在不同的病毒分离株中变化很大, UK 的缺失虽然不影响病毒在体外巨噬细胞的增殖能力, 但显著减弱了病毒在猪体内的毒力(Zsak 等, 1998)。另一个基因是 23-NL, 它编码 NL 蛋白, 一种与细胞内 MyD116 以及和单纯疱疹病毒神经毒力因子 ICP34.5 相似的蛋白质(Sussman 等, 1992; Zsak 等, 1996), ASFV E70 毒株缺失 23-NL, 可降低病毒在猪体内的毒力而不影响其在体外巨噬细胞中的复制能力。

还有一些基因的缺失，如六个 MGF360 基因和两个 MGF530 基因的大量缺失可显著降低病毒在巨噬细胞中的复制能力（Neilan 等，2002）。而最近研究显示，这些基因的缺失与病毒毒力的降低密切相关，这种缺失可以通过在建立的细胞系中自然传代突变（Krug 等，2015），也可通过基因操作人工突变技术（O'Donnell 等，2015b；Reis 等，2016；Sanchez-Cordon 等，2016）。比如强毒株 Georgia2007 和 Benin 经上述基因的突变后，可完全减毒并且能够有效诱导针对同源病毒感染的保护（O'Donnell 等，2015b；Reis 等，2016；Sanchez-Cordon 等，2016）。

此外，最近还鉴定了一种新基因 DP148R（Reis 等，2017）。该基因与 MGF360 / 530 基因一样，可参与干扰素应答调节，Benin 分离株缺失了该基因后降低了猪体上的毒力，并诱导针对同源病毒的攻毒保护。

这些研究对提高我们对 ASFV 发病的分子基础和病毒蛋白在疾病发展中的特殊作用的理解具有重要意义。



ASF 慢性感染的发病率和死亡率低于急性和亚急性感染，强烈组织损伤和淋巴细胞数量减少等严重炎性变化导致了动物的死亡。研究由低毒力 ASFV 分离株诱导的慢性感染的致病机制可以提供有用的信息。对动物感染后存活的机制尚不清楚，其中涉及病毒携带动物表观的保护性免疫应答的机制。

通过遗传操作或通过适应不同细胞系技术来获得减毒株，为减毒机制的研究提供了有价值的工具。使用亲本毒株与其衍生的减毒株在宿主和病毒行为方面进行比较分析，特别是在感染的早期阶段，将提供关于宿主和病毒在导致病毒毒力减弱过程中相关机制的关键数据。特别有趣的是，利用亲本强毒/衍生弱毒配对，可实现单基因差异比较，以消除不同病毒毒株之间由于不同遗传背景产生的影响。利用亲本强毒/衍生弱毒配对病毒分别感染猪只，还可分析 ASFV 强弱毒株在复制模式、感染动力学、微观和宏观病理学以及对宿主基因激活模式等方面的差异。

ASFV 病理学基础知识的重大未知问题涉及：

- 1) 动物之间感染控制的基本管理机制。
- 2) 宿主与病毒互作过程中的不同层面的分析。
- 3) 具有不同毒力的病毒诱导发病过程中的分子差异
- 4) 特定基因组决定簇在疾病发展中的作用

研究需求

- 1) 掌握宿主间相互感染的基本参数，包括家猪和野猪以及昆虫寄主。
- 2) 研究不同易感宿主中不同毒力的 ASFV 分离株的发病机制。
- 3) 确定免疫相关宿主基因的激活模式，特别是在感染的早期阶段。
- 4) 鉴定涉及宿主范围，毒力和致病性的 ASFV 基因和遗传决定因子（如多基因家族的基因组）。

免疫学

研发一个安全有效的 ASF 疫苗的关键问题是缺乏相关的免疫学知识。用感染非洲猪瘟病毒的细胞提取物、感染 ASFV 的猪外周血粒细胞的上清、纯化和灭活的病毒粒子、戊二醛固定的感染的巨噬细胞，或用去垢剂处理的感染的肺泡巨噬细胞来接种动物，均未能诱导保护性免疫（Coggins 1974；Forman 等，1982；Kihm 等，1987；Mebus 1988）。但是，在 ASFV 感染康复猪体内确实形成有效的同源保护性免疫。用中等毒力或减毒的 ASFV 突变株接种后，急性感染存活的猪对同源病毒攻毒产生长期抗性，但对异源病毒的抵抗却很小（Hamdy 和 Dardiri 1984；Ruiz-Gonzalvo 等，1981）。用毒力基因/宿主感染基因缺失的 ASFV 减毒株免疫猪只，可对同源亲本强毒的攻毒起到保护（Lewis 等，2000；Moore 等，1998；Zsak 等，1996 和 1998）。体液免疫和细胞免疫是机体对 ASFV 产生有效保护性免疫的重要组成部分。抗 ASFV 的抗体足以保护猪群免受致死 ASFV 的感染（Hamdy 和 Dardiri 1984；Onisk 等，1994；Ruiz-Gonzalvo 等，1981）。尽管目前

已有针对 ASFV 病毒结构蛋白 p30, p54 和 p72 的中和抗体的报道 (Borca 等, 1994a; Gomez-Puertas 等, 1996; Zsak 等, 1993), 但它们不足以产生抗体介导的保护免疫 (Neilan 等, 2004)。CD8⁺淋巴细胞在抗 ASFV 的保护性免疫应答中也起一定作用 (Oura 等, 2005)。

与其他大 DNA 病毒类似, ASFV 也会影响和调节宿主的免疫应答。被 ASFV 感染的巨噬细胞会诱导细胞免疫功能的变化, 它们可能介导了淋巴组织的严重凋亡 (Childerstone 等, 1998; Oura 等, 1998c; Ramiro-Ibaez 等, 1996; Takamatsu 等, 1999)。ASFV 可以抑制由佛波肉豆蔻酸诱导的 TNF- α 、IFN- α 和 IL-8 等促炎细胞因子的表达, 同时诱导感染的巨噬细胞产生 TGF- β (Powell 等, 1996)。相反, 有研究表明无论在体内还是体外, 感染 ASFV 后, TNF- α 表达上调, 提示 TNF- α 可能在 ASFV 的发病机制中发挥关键作用, 因为 TNF- α 会对血管通透性、血液凝固和诱导未感染淋巴细胞凋亡等方面进行调节 (Gomez del Moral 等, 1999; Salgu 等, 2002 和 2005)。更为重要的是, 在感染早期, 不同毒力的 ASFV 分离株, 在诱导巨噬细胞表达促炎因子或 IFN 等相关基因的能力不同 (Afonso 等, 2004; Gil 等, 2003; Zhang 等, 2006)。ASFV 的 pA238L (5EL) 是一个具有 ankyrin 重复基序的蛋白, 它是目前已知的唯一一个与细胞 I κ B 蛋白具有同源性的病毒蛋白。I κ B 是细胞转录因子 NF κ B/Rel 家族的细胞质内的抑制剂, 所以 pA238L 在介导宿主免疫逃避方面可能具有重要作用 (Miskin 等, 1998; Powell 等, 1996)。pA238L 的特性为我们理解 ASFV 如何通过调节宿主细胞对感染的免疫反应提供了新的机制。特别是 NF κ B 转录信号通路在诱导多种促炎因子, 抗病毒介质和细胞因子的表达发挥重要作用。与上面的功能相似, pA238L 还可以调节环氧合酶-2 (COX-2)、TNF- α 和可诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 的表达。COX-2 下调的发生是依赖于 NFAT 信号通路, 而不是 NF κ B 通路 (Grasja 等, 2004b)。类似地, pA238L 可以抑制 iNOS 的表达并最终抑制一氧化氮的产生。这个机制可能通过 p300 的反式激活来介导的。有趣的是, 把 A238L 基因从致病性的 ASFV 中敲除, 并不影响病毒在巨噬细胞中的复制能力或在家猪体内的致病性和毒力 (Ne 等, 1997b)。此外, ASFV 编码的其它一些蛋白也参与调节或者干扰宿主的免疫应答。ASFV 8DR 蛋白 (pEP402R) 是目前已知的唯一的一个 CD2 受体的病毒同源物, 而 CD2 是 T 细胞的表面蛋白参与和共同调节细胞的活化 (Borca 等,

1994b; Rodriguez 等, 1993a)。8DR 在介导 ASFV 感染细胞对血细胞的吸附过程发挥充分必要作用。对 (Borca 等, 1994b; Rodriguez 等, 1993a)。把 8DR 基因从 ASFV 基因组中敲除可以降低病毒在感染早期在猪体的复制和感染的建立。而且 8DR 体外实验可以抑制细胞免疫应答 (Borca 等, 1998)。ASFV 的 pEP153R (8CR) 蛋白与细胞源性蛋白以及痘病毒蛋白类似, 像 C 型凝集素样蛋白, 这包括膜结合的免疫激活蛋白 CD69 和免疫调节蛋白 NKG2 (Neilan 等, 1999; Yanez 等, 1995)。pEP153R 在免疫调节中的作用可能是微妙的, 因为 pEP153R 不影响 ASFV 在家猪体内的致病性或毒力 (Neilan 等, 1999)。相关证据还表明 ASFV 显著影响 Th2/B 细胞应答, 如被 ASFV 感染的单核细胞可以释放可溶性毒力因子 p36 并且导致 Th2 细胞因子的上调, 在 ASFV 感染的动物中可以观察到 B 细胞群的非特异性激活和凋亡 (Takamatsu 等, 1999)。ASFV 多基因家族 360 和 530 在调节宿主固有免疫中起一定作用。与野生型毒株不同, 感染 Pr4Δ35 缺陷毒株 (一种缺乏 MGF360/530 基因的突变病毒) 的巨噬细胞导致几种 I 型干扰素早期反应基因的 mRNA 水平升高 (Afonso 等, 2004)。分别对感染后 3、8 和 24 小时 IFN- α 的 mRNA 和分泌的 IFN- α 的水平进行分析, 发现空白对照组和野毒感染组的巨噬细胞中均检测不到 IFN- α , 但在 Pr4Δ35 突变株感染组的巨噬细胞中感染 24 小时后, IFN- α 水平则显著升高。表明 MGF360/530 基因直接或间接地抑制 I 型干扰素应答。这种效应可解释为什么 PR4Δ35 毒株在巨噬细胞中表现出生长抑制并且其毒力在猪体内的衰减的现象 (Zsak 等, 2001)。

在这方面, 也有相关的一些研究支持 MGF 基因功能在对 IFN 调控反应中的重要性, 以及它们在病毒毒力中的重要性。最初 Neilan 等, 在 2002 年进行的研究表明, MGF360/MGF530 基因的缺失会降低病毒在巨噬细胞中的复制。这一结论最近又被多个课题组完善, 发现这些基因的缺失与猪感染实验中病毒毒力的降低密切相关 (Krug 等, 2015; O'Donnell 等, 2015b; Reis 等, 2016; Sanchez-Cordon 等, 2016)。类似地, 最近鉴定的基因 DP148R 的缺失也参与了干扰素应答调节, 降低了 Benin 分离株对家猪的毒力 (Reis 等, 2017)。

在猪体内 ASFV 蛋白的免疫原性的鉴定也取得了重要进展。例如, 现在有几个研究发现单独表达 ASFV 抗原的多种载体都可以激发机体的细胞免疫和抗体反应。这些载体有: 痘病毒载体 (Lopera-Madrid 等, 2017)、DNA (Argilaguet 等,

2012; Argilaguet 等, 2013; Lacasta 等, 2014)、腺病毒载体 (Lokhandwala 等, 2016; Lokhandwala 等, 2017) 或这些载体的组合 (Jancovich 等, 2018)。这些研究中有的可能做的更加深入, 已经进一步评估了这些病毒蛋白在猪体内诱导保护性免疫反应的能力 (Argilaguet 等, 2012; Argilaguet 等, 2013; Lacasta 等, 2014; Jancovich 等, 2018 年)。然而, 迄今为止, 这些研究中的大多数结果均未达到 50% 的免疫保护率, 提示需要进一步开展工作以鉴定更多的参与诱导保护性免疫应答的病毒抗原。

总之, 针对几种 ASFV 蛋白的免疫原性鉴定, 目前已经积累了大量的数据。重要的是, 有些病毒蛋白诱导猪体的保护性免疫应答的能力已经获得了评估, 这是开发亚单位疫苗的第一步。



迄今为止, 尝试使用不同的疫苗平台诱导保护性免疫均失败。在中等毒力或实验室减毒的 ASFV 突变株急性感染中存活的猪体内发生同源保护性免疫。这些动物仅对同源强毒的攻毒产生长期抗性, 但对异源病毒的攻击抵抗很小。体液和细胞免疫已被证明是对 ASF 的保护性免疫应答的重要组成部分。然而, ASFV 抗体不足以保护猪免受致死型的 ASFV 感染。尽管已经描述了 ASFV 针对特定病毒蛋白的中和抗体, 但它们不足以用于抗体介导的保护。另外, CD8⁺淋巴细胞似乎也在抵御 ASFV 感染的保护性免疫应答中起作用。因此, 尽管体液和细胞免疫应答参与了抵抗病毒感染的保护作用, 但是调节该保护作用的实际免疫机制仍不清楚。对于诱导保护性免疫机制的病毒蛋白仍然是未知的。另一方面, 一些研究已表明, ASFV 的许多蛋白在体外可影响和调节宿主免疫应答。

如上所述, 在 ASFV 免疫学上的进展主要包括鉴定调节宿主免疫应答的病毒基因并且理解其功能, 以及其在自然感染过程中的直接作用等。此外, 在天然宿主上, 很多之前没有被鉴定的病毒蛋白的免疫原性的研究获得重要进展。目前关键未知空白包括:

- 1) 明确介导猪只产生抗感染免疫的机制仍然是需回答的主要问题之一。
- 2) 进一步鉴定诱导产生保护性免疫反应的病毒蛋白。

- 3) 了解病毒在感染过程中产生的对宿主的免疫调节作用。
- 4) 异源病毒毒株之间的相关保护性尚不清楚。

保护机制

目前，在 ASFV 实验疫苗诱导的保护机制方面存在较大的空白。目前有几个实验性地在基因组上有单基因或双基因的缺失的 ASFV 可作为减毒活疫苗候选，但这些候选疫苗如何抵御 ASF 在很大程度上是未知的。除了可以预测基本的蛋白功能之外，目前仍然缺乏对单个 ASFV 蛋白在诱导免疫保护中的特定作用。与保护力相关的细胞免疫和体液免疫机制在很大程度上也没有确定。此外，病毒(或实验疫苗)持续性感染的机制尚不清楚。这对于理解并避免减毒活疫苗在野外持续存在是非常重要的，也有利于理解和预测减毒分离株的持续性感染。

对 ASFV 或任何实验性疫苗的细胞免疫应答在很大程度上是未知的，部分原因是缺乏对猪体的免疫学知识。目前，哪些特定细胞类型涉及诱导免疫应答或者哪些细胞类型涉及诱导对 ASFV 的长期保护在很大程度上是未知的。迄今为止，很少发现 ASFV 的中和或 T 细胞表位。最近表达的 p30, p54, p72 可产生中和抗体，但这些抗体不能赋予 ASFV 保护作用 (Neilan 等, 2004)。提示我们需要更广泛地了解抗体在保护或疾病增强中的作用，因为产生的抗体有可能不参与疾病的中和作用，却可能抑制病毒的传播。另外，抗体介导的疾病增强也有可能发生，因为巨噬细胞摄入病毒可能由抗体 Fc 受体介导完成。了解抗体对 ASFV 和 ASFV 介导免疫应答的作用可以让我们明白不同 ASFV 分离株之间毒力的差异，并可能了解为什么一些野生非洲猪虽然感染了但临床上没有任何 ASF 临床症状。了解这些保护机制将有助于生产更安全的疫苗，包括创建亚单位疫苗的可能性。

异源病毒株间保护的相关性

异源病毒毒株之间的交叉保护在很大程度上是未知的，部分由于缺乏不同 ASFV 毒株的可用序列，ASFV 的多样性尚不清楚。很大程度上非洲的田间毒株研究很少，特别是在目前的流行地区。在此分析中确定的两个可能的国家是乌干达或坦桑尼亚。在这两个使用地方性毒株进行疫苗实验的国家，可以允许测试涉及大量动物的长期疫苗研究。

了解交叉保护的机制将会有利于下一代疫苗产生更好的交叉保护，并有利于预测若新出现 ASFV 毒株的暴发该使用何种疫苗。了解参与交叉保护的特定病毒蛋白，将涉及对当前循环 ASFV 毒株进行测序以及对不同毒株的大型交叉保护研究的大量工作。

研究需求

- 1) 发现介导对病毒感染的有效同源和异源保护的免疫机制。
- 2) 鉴定与同源保护和异源保护的存在/不存在相关的病毒遗传模式。
- 3) 鉴定参与诱导保护性免疫应答的病毒蛋白。
- 4) 鉴定涉及促炎细胞因子和抗体产生的调节基因，并评估它们在猪体病毒感染/毒力上的实际作用。
- 5) 探索用于疾病监测早期的基于细胞免疫的新方法。
- 6) 提高我们对多基因家族在抗原变异性和免疫反应逃避中作用的理解。
- 7) 鉴定与宿主保护相关的基因。

疫苗

目前没有可用的 ASFV 商品苗，也从来没有出现过有效的 ASF 商品苗。表 3 展示了在 2012-2018 年间，同行评审的科学出版物中报道的在实验条件下研究的 ASF 疫苗的摘要。实验猪通过接种在组织培养物中传代得到的致弱株或敲除了毒力相关基因得到的弱毒株或低毒力的野毒分离株可以实现同源保护 (Lewis 等, 2000; Leitao 等, 2001; Boinas 等, 2004)。通常这些动物对同源的病毒攻毒可以产生长期的抗性，但却很少能对抗异源毒株的感染 (Hamdy 和 Dardiri 1984; Ruiz-Gonzalvo 等, 1981)。不同分离株之间缺乏交叉保护成为 ASF 疫苗开发中需要考虑的重要问题。

由于缺失 CD8 + T 细胞功能可导致保护作用的消除，证明免疫保护机制涉及到了细胞免疫 (Oura 等, 2005; Denyer 等, 2006)。被动免疫抗体可以提供部分攻毒保护，提示抗体在免疫保护中起到一定的作用 (Onisket 等, 1994)。实验

中使用 p54 和 p30 两种重组蛋白组合或者使用重组 CD2 样蛋白也能实现部分保护 (Ruiz-Gonzalvo 等, 1996; Gomez-Puertas 等, 1998)。但当使用具有强毒力的 ASFV 分离株时, 有些结果重复不出来 (Neilan 等, 2004)。在这些动物试验中未能实现完全保护可能是因为抗原的递呈方式问题和/或需要更多不同的抗原才能提供足够的保护。或者只有通过使用减毒的能复制的 ASF 活病毒作疫苗才能实现完全保护。

使用特定的毒力/宿主谱相关基因缺失的减毒活病毒免疫猪 (见 Dixon 等, 2008 和 Tulman 等, 2009 的综述)能在同源病毒攻毒时产生保护作用 (Lewis 等, 2000; Moore 等, 1998; Zsak 等, 1996 和 1998)。这项主要对传统毒株改造的前期工作最近已经扩展到当前新流行的分离株上。此外还鉴定出一些新的敲除后可致病毒减毒的靶基因。例如, 在 Georgia 2007 分离株 (O'Donnell 等, 2015a) 中敲除在 Malawi 分离株 (Lewis 等, 2000) 中描述的 9GL 基因会导致病毒减毒, 证明它可以作为一种能抵抗同源毒株感染的试验苗。其他遗传操作包括在 Georgia 2007 分离株 (O'Donnell 等, 2015b) 或贝宁株 (Sanchez-Cordon 等, 2018; Reis 等, 2016) 中敲除一组 MGF 基因, 或此前没有介绍过的 DP148R 基因 (Reis 等, 2017) 都能减弱亲本株的毒力并且能保护其免受同源强毒株的感染。

有趣的是, 在同一株病毒中敲除多个基因的复杂遗传操作首次在 Georgia 2007 分离株中实现。一开始有些试验导致了毒株严重减毒但不能诱导保护性免疫应答 (O'Donnell 等, 2016a; Abrams 等, 2013), 而 9GL 和 UK 基因双缺失的 Georgia 2007 株突变株的构建成功地提高了疫苗的安全性和免疫原性 (O'Donnell 等, 2016b)。

使用 ASFV 疫苗的一个问题是在同一地区内循环的毒株的潜在遗传多样性。虽然有些信息表明不同基因型的病毒之间存在交叉保护, 但直到最近才有实验证明这个论点。从 Badajoz71 分离株中敲除 CD2 样基因会得到减毒毒株, 它能诱导对同源亲本株的保护, 也能诱导对异源 Spain75 和 Armenia2010 分离株的保护作用 (Monteagudo 等, 2017)。这种特殊的病毒具有在已建立的细胞系中生长的特性, 这对于需要以高滴度生长的用于疫苗生产的潜在疫苗株是至关重要的。因此, 开发能对几种基因型感染都产生交叉保护的疫苗是有可能的。

鉴定和研究与 ASFV 毒力和逃避宿主免疫应答相关的新型基因仍然很有必

要，因为可以通过缺失/修饰这些基因来促进和改善减毒疫苗的开发。虽然现在仍然需要更进一步的研究，但开发有效的疫苗比几年前看起来更加有实现的可能。

由于缺乏对能诱导免疫保护的病毒抗原的鉴定工作，基于保护性抗原的表达来研究亚单位疫苗的方法没有显著进展。最近开发的构建重组病毒载体的高通量方法开辟了全面分析所有 ASFV 可表达基因的免疫保护潜力的新途径。一些报道研究了使用多种表达载体单独表达 ASFV 抗原引发的细胞和抗体应答。因此，使用不同的标准选择的几种不同的病毒蛋白已经通过使用牛痘（Lopera-Madrid 等，2017）、DNA 免疫（Argilaguët 等，2012；Argilaguët 等，2013；Lacasta 等，2014）、腺病毒（Lokhandwala 等，2016；Lokhandwala 等）或其组合（Jancovich 等，2018）的方式用于猪的免疫。有些报告仅报道由不同载体表达的每种病毒抗原引起的免疫应答（Lokhandwala 等，2016；Lopera-Madrid 等，2017；Lokhandwala 等，2017），而没有评估免疫对攻毒的保护作用。涉及攻毒试验的研究报告（Argilaguët 等，2012；Argilaguët 等，2013；Lacasta 等，2014；Jancovich 等，2018）报道的保护率未达到 50% 以上。这些结果表明需要进一步鉴定更多的参与诱导保护性免疫应答的病毒抗原。此外，使用亚单位疫苗平台可能需要优化免疫方案，包括选择有效的疫苗载体。据报道，使用牛痘和腺病毒载体表达 8 种未公开的特异性病毒蛋白对猪进行连续免疫，可以对强毒性 Benin 分离株的攻毒产生 100% 的免疫保护（Netherton 等，2018）。这是迄今为止唯一表现出完全保护效力的 ASFV 亚单位疫苗的报告。



未知空白

虽然减毒活疫苗似乎是最有希望的，但其中一个主要的问题是安全性。什么是安全的疫苗可能取决于它将被部署的区域；例如，选择一个与在流行地区循环的 ASFV 毒株具有相同骨架的疫苗，在疫情爆发阶段部署与在未感染区域中部署是截然不同的。目前还没有具备区分感染与免疫标记物（DIVA）的疫苗。

目前还没有细胞系能够用来进行疫苗生产，这导致了 ASFV 疫苗研究的另一个显著缺陷。没有经过验证的细胞系，就不可能实现 ASFV 疫苗的商业化。唯一一个报道的可以用来生产减毒活疫苗细胞是原代猪巨噬细胞，但这难以在商业

上用于大规模疫苗生产。

阻碍安全有效的 ASF 疫苗的研发，特别是以控制和根除为目的设计的疫苗的一些关键的未知问题包括：

- 1) 尚未充分鉴定和阐释 ASFV 的毒力因子，从而限制了减毒疫苗株的开发。
- 2) 用于 ASFV 疫苗生产的永生化细胞系的缺失。
- 3) 可以诱导对基因工程亚单位疫苗产生保护性免疫应答的 ASFV 基因产物的缺失。
- 4) 保护性免疫机制不清楚。
- 5) 不同 ASFV 毒株之间的抗原多样性及其针对异源毒株的疫苗交叉保护的影响不明。
- 6) 需要用于区分感染和免疫动物 DIVA 的标记抗原的鉴定。

研究需求

- 1) 指导疫苗研发的 ASFV 病毒学和功能基因组学研究。
- 2) 确定实验减毒活疫苗的安全性。
- 3) 鉴定能够促使 ASFV 生长的肺泡巨噬细胞基因，为用于疫苗生产的细胞系的开发提供指导。
- 4) 设计基因缺失的 ASFV 作为潜在的候选疫苗。

诊断

有多种实验室技术可用于 ASF 病毒和抗体检测，推荐两者结合进行 ASFV 检测。重要的是要指出 ASF 具有三个显著检测优势：i) 病毒血症通常在感染后 2-3 天开始出现并持续数周；ii) 血液中高水平的特异性抗体可在感染后 8-15 天检测到，可持续很长时间甚至数年；iii) 由于没有可用的疫苗，特异性抗体是非常好的感染标识（如果出现在动物死亡之前）。然而，利用中等毒力毒株通过口服和肌肉注射感染仔猪、青年猪和成年野猪，均产生急性 ASF 症状，且在不到 12 天内导致 100% 死亡，血清中未检测到抗体应答，也不能对与之接触的家猪和

野猪产生有效传播 (Gabriel 等, 2011; Blome 等, 2012)。在实验条件下, 无论感染剂量如何, 老年猪在感染中等毒力 ASFV 分离株后似乎比年轻猪具有更好的存活率 (Post 等, 2017)。

特异性非洲猪瘟 IgG 抗体在感染猪体内长期持续存在为检测亚急性和慢性 ASF 提供了基本策略, 这对 ASF 根除计划至关重要。很多技术都可以用来进行 ASF 抗体检测, 但最常见、最实用且最廉价的检测通常使用酶联免疫吸附试验 (ELISA); 免疫印迹试验 (IB)、间接免疫荧光抗体试验 (IFA) 和免疫过氧化物酶试验 (IPT) 用来进行验证测试。ASF 实验室诊断应采集以下样品: 来自活体或濒死动物的全血, 扁桃体刮片和/或扁桃体拭子, 以及来自病死猪的淋巴结、肾、脾、肺、血液和血清。组织可用于病毒分离 (红细胞吸附实验), 病毒抗原检测 (直接免疫荧光试验) 和病毒 DNA 检测 (PCR), 而血液、扁桃体刮片和扁桃体拭子只能用于用于病毒分离和病毒 DNA 检测。血清可通过 IFA、ELISA 或 IB 进行抗体检测。组织分泌物可通过 PCR 进行病毒检测, 亦可通过上述血清学诊断方法进行抗体检测。

最常用的病毒检测和鉴定方法是红细胞吸附试验 (HA)、直接免疫荧光 (DIF) 以及 PCR (自 2000 年以来)。除了 PCR 以外, 上述技术中没有一种是商品化的, PCR 试剂盒中包含冻干的试剂, 以及复溶的缓冲液和阳性对照 (Zsak 等, 2005)。

病毒检测技术

病毒检测和分离。 鉴于红细胞吸附试验 (HA) 的敏感性和特异性, HA 常用于 ASFV 确诊。红细胞吸附试验是利用红细胞能吸附在体外培养的感染 ASFV 的巨噬细胞膜表面, 在细胞病变出现之前, 红细胞能在巨噬细胞周围形成典型的玫瑰花环。重要的是, 已观察到少数田间毒株仅出现细胞病变而不产生红细胞吸附现象。这些毒株可利用 PCR 和/或 DIF 对细胞培养物进行鉴定。

ASF-DNA 检测。 自 2000 年以来, 已经开发了很多基于常规和实时程序的 PCR 方法, 其中一些已经过验证 (OIE, 2000; Agüero 等, 2003; King 等, 2003)。这些方法根据病毒基因组中高度保守区域 VP72 设计引物对, 可利用 PCR 技术鉴定 ASFV 分离株及其所属的基因型。这是一种极好且相对快捷的技术, 适

用于 ASF 的流行病学监测和诊断。

直接免疫荧光 (DIF)。 DIF 是基于组织触片或冷冻切片上的病毒抗原与抗 ASFV 免疫球蛋白相结合的检测方法。DIF 用于检测急性 ASF 具有非常快速 (一小时)、经济 and 高度敏感性的特点。检测亚急性或慢性 ASF 时, DIF 的敏感性的只有 40%。这种敏感度的降低可能与感染猪组织内的抗原-抗体复合物的形成有关, 其阻断了 ASFV 抗原与标记的抗 ASFV 免疫球蛋白结合。

此外, 还有一种独特的商品化 ELISA 病毒抗原检测方法, 即 Ag-ELISA。DIF 和 Ag-ELISA 在检测同时存在抗原-抗体复合物的慢性 ASF 中表现出非常低的敏感性。这些技术仅推荐用于诊断急性 ASF。在慢性 ASF、区域流行或个体诊断的情况下, 不推荐使用这种抗原检测技术。

附加测试。 近年来, 许多诊断平台改进了 ASF 诊断方法, 其中大多数是基于 DNA 检测, 或为多重检测技术的一部分 (Lung 等, 2018; Xiao 等, 2018; Erickson 等, 2018; Hu 等, 2015; Shi 等, 2016; Sastre 等, 2016) 或为单一检测, 包括便携式 PCR 系统 (Liu 等, 2017)、侧向流动装置 (Sastre 等, 2016) 以及新的平台: 如使用生物传感器 (Mujibi 等, 2018)、液滴数字 PCR (ddPCR) (Wu 等, 2018)、重组酶聚合酶扩增 (RPA) (Wang 等 2017)、聚合酶链式螺旋反应 (PCLSR) (Wozniakowski 等, 2017)、等温交叉引发扩增 (CPA) (Fraczyk 等, 2016), 其中一些检测时间短至 10 分钟, 灵敏度和特异性等同于 OIE 推荐的 ULP-PCR。

抗体检测技术

抗体 ELISA。 这是进行大规模血清学研究的最佳方法。目前, 至少有三种商品化的 ELISA 正在使用 (来自 Ingenasa, Svanova 和 IDVet)。其他 ELISAs 在内部使用或正在开发和验证过程中, 并且都有其优点和缺点, 在测试可疑或不良质量的样本时应该考虑这些优点和缺点。该方法是用于检测与固相载体上附着的病毒蛋白相结合的 ASFV 抗体, 再加入 A 蛋白-酶偶联物显色, 当酶与合适的底物反应时出现可见的颜色。商品化的抗体 ELISA (PPA 公司) 已经上市, 该产品已由西班牙中央参考实验室 (CRL) 验证。CRL 还可根据申请提供 OIE “内部

使用”的 ELISA 方法步骤以及用于 OIE ELISA 测试的标准化/验证可溶性抗原。

免疫印迹试验 (IB)。这是一种高度特异，敏感且简单易学的技术，它被成功地用作 IFA 的替代方法，亦被推荐用于 ELISA 阳性或可疑结果的验证试验。目前没有商品化的 IB 试剂盒，标准化/验证过的 IB 抗原条应由自己的实验室制备，也可向 CRL 申请。然而，由于 IB 抗原条生产的复杂性，其每年的量是有限的。

间接免疫荧光抗体试验 (IFA)。IFA 无论是检测血清还是检测组织渗出物中的 ASF 抗体都有很高的敏感性和特异性。该方法以检测结合于已适应细胞培养的 ASFV 感染的单层细胞的 ASFV 抗体进行确诊。通过荧光素标记的 A 蛋白检测抗原-抗体反应。

免疫过氧化物酶试验 (IPT)。IPT 是一种在固定细胞上通过过氧化物酶作用测定抗体-抗原复合物形成的免疫细胞化学技术。在该过程中，Vero 或 MS 细胞被于感染适应这些细胞培养的 ASFV 分离株。将感染的细胞固定并用作抗原，以确定血清样品中针对 ASF 的特异性抗体的存在 (Gallardo 等，2015)。

关于现场检测，最近，Cappai 等 (2017 年) 报告了一种商品化血清学现场检测方法在意大利撒丁岛的使用和验证。所使用的方法是由 Ingenasa (INgezim PPA CROM) 生产的侧向流动装置 (LFD)。在野外条件下，对猎杀野猪的敏感性为 82%，特异性为 96% (在实验室条件下表现更好)。结果已经证明，使用现场检测在能快速提供结果的同时，更加便宜更加省力。因此，在某些条件下可以考虑使用这些检测方法。

使用病毒学检测技术 (推荐使用 PCR 检测，因为抗原检测技术，如 DIF 和抗原 ELISA 在检测慢性 ASF 时敏感性较低) 同时使用血清学检测 (ELISA，再利用 IPT/IFA 或 IB 确认阳性和可疑结果) 使得能够在非常短的时间内准确、可靠地检测所有 ASF 流行病学情况 (急性、亚急性和慢性)。

ASFV 分离物的鉴定按照国际上建立的标准化规程进行，由欧盟实验室通过基因分型进行。基因分型策略涉及 ASFV 基因组上三个独立区域的测序：i) VP72 的基因的 C 端；ii) VP54 的全基因；iii) ASFV 基因组内命名为 CVR (中心可变区) 的可变区，其以存在串联重复序列 (TRS) 为特征。在使用 CVR 分析之前，

VP72 的部分以及 VP54 全长测序将 ASFV 分离株置于主要亚型中，以解决导致 ASF 暴发的病毒基因组内关系。该方法提供了 45 年间在欧洲、美洲和非洲流行的病毒株的额外信息。此外，这些方法可以确定过去几年在欧洲（意大利和高加索地区的国家）和非洲发生的导致 ASF 暴发的病毒的遗传关系和起源。

ASF 诊断的最新进展

病原检测的进展

最近，进行了一项研究以比较当前东欧暴发框架下的现有诊断测试系统（Gallardo 等，2015）。本研究结果显示，通用探针库（UPL）PCR（Fernandez-Pinero 等，2013；Gallardo 等，2015）是最敏感的方法，其次是 OIE 采用的实时 PCR（King 等，2003）和常规 PCR。总体而言，这些方法之间的一致性较好（UPL 和实时 PCR 之间为 94%；UPL 和常规 PCR 之间为 88%）。商品化抗原 ELISA（Ingenasa-Ingezim PPA DAS K2；Ingenasa）敏感性约为 77%。

等温扩增方法可以帮助在基层实验室甚至野外环境下进行诊断，并且已在过去几年进行了研究。已经尝试使用于 ASFV 检测的等温方法是交叉引物扩增（针对 p72 基因）。Fraczyk 等（2016）证明该方法与 UPL PCR 一样敏感，至少在所选条件下是这样。针对拓扑异构酶 II 基因的环介导等温扩增技术（LAMP）测定获得了类似的结果。除标准设置外，还显示可通过在侧向流动装置上使用双标记生物素和荧光素扩增子进行结果目测（James 等，2010）。除其他等温方法外（如 RPA），在过去几年中，已对几种不同的野外用 PCR 机型进行了测试。但是，这些方法还需要进一步评估。

抗体检测的进展

对于 ASF 抗体检测，最近测试了五种血清学方法，包括三种商品化 ELISA（来自 Ingenasa、IDVet 和 Boehringer Ingelheim Svanova）、OIE-ELISA 以及通过验证的免疫过氧化物酶试验（IPT）。IPT 被证明是最敏感的方法，并且可以用来检测组织渗出物（Gallardo 等，2015）。IPT 还能在血清学反应早期存在很少的抗体时检测到 ASF 抗体。

总体来说，所获得资料主要是适宜的抗原及其表达产物在 ASF 血清学诊断中的应用。对现有数据的评估还揭示了这些方法在用于大范围检测的优势和劣势（Perez-Filgueira 等，2006；Cubillos 等，2013）。对于非洲环境，已经证明 Morara/Georgia 的重组 p30 能够反映整体情况。这些数据已为（参见 Svanovir ELISA 和 IDScreen）且将为 ASF 抗体的早期准确检测新方法的研发提供素材。目前至少有三种商品化 ELISA 正在使用（来自 Ingenasa, Svanova 和 IDVet），其他的方法都正在开发和验证中。所有这些测试都有不同的优点和缺点，特别是在检测劣质野猪血清时。各实验室之间的检测结果有所不同。

现场检测、替代采样方法和检测方案的最新发展

关于现场检测，最近，Cappai 等（2017 年）报告了一种商品化血清学现场检测方法在意大利撒丁岛的使用和验证。所使用的方法是由 Ingenasa（INgezim PPA CROM）生产的侧向流动装置（LFD）。在野外条件下，对猎杀野猪的敏感性为 82%，特异性为 96%（在实验室条件下表现更好）。结果已经证明，使用现场检测在能快速提供结果的同时，更加便宜更加省力。因此，在某些条件下可以考虑使用这些检测方法。

除了用于单一检测 ASF 的 LFD 之外，已有报道跟 CSF 一起的多重检测，这将有助于这两种疾病的监测（Sastre 等，2016）。

数据在 Pulawy 的最后一次 ASF-STOP 会议上提出，侧向流动装置也可以与血液拭子结合使用（Carlson 等提供）。

用于检测病毒抗原的 LFD 已有报道（Sastre 等，2016）。该方法显示出与抗原 ELISA 相当的灵敏度。通常，可检测到 $> 10^4$ HAU 的病毒载量。因此，死于 ASF 的患病动物或死于 ASF 的动物应为阳性（在大多数情况下）。与其他方法相结合，该方法可以用于偏远地区或其他有问题的地域（例如无法运输的野猪尸体）的快速检测，但如上所述，其灵敏度有限。

非侵入性采样策略意味着可避免通过必要的狩猎/捕获采样方案来优化野生动物监测方案，以减少损伤性采样导致病毒进一步扩散的最坏的情况。最近，在实验和野外条件下评估了几种不同的活体采样方法。

非侵入性采样方法的一个选择是采集野猪栖息地的粪便。沿着这些路线，de

Carvalho Ferreira 等（2014）测试了粪便样品的适用性。他们证明，与检测血液中的病毒相比，同一时间粪便中检测到病毒的概率在 50-80%。对于 ASF 亚急性或慢性病例，该检测百分比降至 10% 以下。尽管在感染过程中的病毒检测存在相当多的变化，但研究表明 ASFV 的 DNA 在粪便中是相当稳定的（在 12°C 下半衰期超过两年或在 30°C 时接近 15 天），因此，粪便检测可以作为常规监测的补充方法。除可用于病毒基因组检测外，最近还发现粪便也适用于 ASFV 特异性抗体检测（Nieto-Pelegri 等，2015）。

另一种选择是使用（诱饵）绳索来收集唾液样本。研究表明，唾液样本适用于抗体检测（Mur 等，2013；Giménez-Lirola 等，2016）和病毒基因组检测（Grau 等，2015）。

研究表明，诱饵绳可用于 CSF 监测（Mouchantat 等，2014；Dietze 等，2017）和 FMD 监测（Mouchantat 等，2014），ASF 类似的研究也已在野外和实验室条件下进行。在俄罗斯，有实验表明野猪会咀嚼放在料槽的绳子。

Braae 等（2013）在坦桑尼亚的野外条件下使用 FTA 滤纸采集血液并随后进行 qPCR 检测。在一组临床健康的动物中检测到了病毒 DNA，该检测结果在实验室条件下得到了验证。

这些结果与 Randriamparany 等（2016 年）和 Michaud 等（2007 年）发表的结果一致。在这里，从放置长时间的干血滤纸片（实验和野外样品）中成功诊断（和鉴定）出 ASFV。特别是在热带，在没有冷链和高效的运输系统的情况下，该方法保证了后续检测使用的适用性和稳定性。Randriamparany 等还证明了其抗体检测的适用性。该研究表明，干血滤纸片用于实时 UPL PCR 与通过病毒分离以及常规 PCR 检测一样敏感，并且使用来自滤纸的样本进行 ELISA 检测与血清样本的检测结果一致，不存在特异性问题。

与上述 FTA 卡和干血滤纸片一样，Petrov 等（2014）证明，干血拭子（通常使用不同种类的棉花，泡沫或组织拭子）是一种有价值、稳定且易于操作，可用于检测尸体中 ASFV（和 CSFV）基因组的方法。优点是拭子已经与适合装运的容器组合，并且不需要直接接触或额外设备。在报道的研究中，ThermoFisher 公司的 Genotubes 在样本处理和稳定性方面效果最佳。在随后的概念证明研究中证实了这些拭子适用于 ASFV 抗体的 ELISA 检测（Blome 等，2014）。

最近，这些初始数据得到了更广泛验证研究的补充，该研究还包括与抗体侧向流动装置的组合（Carlson 等提交）。上述验证研究显示 Genotube 样品具有以下性能特征（与常规诊断样品基质和检测相比）：在实验室条件下，qPCR 98.8% 灵敏度[CI93.4, 100.0]和 98.1% 特异性[CI90.1, 100.0]（存储的野外样品特异性为 85.7%[CI 71.5, 99.6]，血清学 ELISA 检测为 93.1%灵敏度[CI 83.3, 98.1]和 100%特异性[CI95.9, 100.0]。在使用上述 Ingenasa 的抗体 LFD 时表现出良好的一致性。这个观点特别有趣，因为它表明几乎没有样品质量差的问题。

对于发病机制和免疫应答研究（疫苗接种/攻毒试验中保护和病毒分布的相关性）以及尸检诊断，Ballester 等（2015 年）描述了一种利用地高辛标记探针检测福尔马林固定、石蜡包埋组织中非洲猪瘟病毒 DNA 的优化原位杂交方案。

基因分型

为了更好地了解最近暴发的分子流行病学，正在研究其他基因组标记物。它们之间有不同的遗传区域。

通过靶向序列捕获技术进行富集可以辅助下一代测序（FernándezPinero, 未发表）。

结论

总之，在过去的几年中，我们的诊断测试工具箱得到显著发展，但仍然需要协调，开发情境适应的诊断工作流程，以及了解疾病生物学常识，这些有助于我们进一步调整我们的方法。下一代测序需要优化和协调工作流程。然而，值得注意的是，在过去几年中，诊断领域已经扩展到寻找新的检测模板。不仅包括已在现有技术中应用的新型样品，如粪便（de Carvalho Ferreira 等，2014；Nieto-Pelegrin 等，2015）、FTA 卡（Braae 等，2013），干血拭子（Petrov 等，2014；Blome，2014）以及唾液样本（Mur 等，2013；Grau 等，2015；Gimenez-Lirola 等，2016），还包括正在寻找的新模板，如：空气样本（de Carvalho Ferreira 等，2013）和饲料（Dee 等，2018）。这一扩展将有助于实现行业所需的更环保，更少侵入性的诊断。

未知空白

通常依靠临床症状来判定为疑似非洲猪瘟感染，但临床症状可能是非特异性的，且难以与猪的其他传染病区分，包括经典猪瘟、丹毒、沙门氏菌病、附红细胞体病、巴氏杆菌病、伪狂犬病、血小板减少性紫癜，华法林中毒和重金属中毒。ASF 流行国家的基层实验室缺乏进行可靠诊断服务的基础设施和/或专业知识。非洲现有的一些基层实验室能力有限，大多数使用荧光试验而非实时 RT-PCR 进行诊断。

诊断的首要不足是：

- 1) 缺乏可用于大规模确诊的商品化检测方法
- 2) 不同流行病学情况的血清学和病毒学试验的验证（例如，低毒力 ASFV 毒株）。
- 3) 需要进行生物学鉴定并确定当前 ASF 毒株的血清型和致病性，这些信息将可帮助我们利用体外试验来推断这些特征
- 4) 为了替换费时且单一的用于病毒分离的原代细胞，需要开发可进行 ASFV 复制的细胞系
- 5) 在开发诊断方法时需要考虑全球 ASF 情况。针对某些情况，量身定制的方法可能是一种选择
- 6) 为了能够利用血清学方法进行早期检测，应改进 ELISA 系统，包括其他可替代的样品基质。
- 7) 为了解遗传多样性，应该开展针对非洲丛林传播循环宿主的研究
- 8) 研发现场检测方法
- 9) 迫切需要从临床和 ASF 诊断的角度增加幸存猪的了解
- 10) 应该研究与致病性相关的新的系统发育标记
- 11) 需要对新检测技术进行现场验证，同时考虑到适用性和整体情况
- 12) 有必要加强国际统一诊断技术的培训和后续活动

研究需求

- 1) 鉴定/开发替代原代细胞的细胞系，以改进病毒分离技术。
- 2) 用于检测替代样品中抗体的新型或改进型 ELISA 方法的验证（例如，血液，组织渗出物，唾液样本，肉汁，滤纸等）。
- 3) 提高商品化诊断试剂盒（分子病毒学和血清学试验）中试剂的稳定性，以解决运输和过期失效问题。这可以通过探索不同的策略来解决，如冻干等。
- 4) 考虑到全球情景，开发用于现场诊断的新型检测方法。
- 5) 开发和评估野生动物的非侵入性采样方法。
- 6) 验证可用的便携式诊断工具，以加强非洲野生生物的检测和改进监测。
- 7) 商品化血清学检测方法的开发、评估和现场验证。
- 8) 开发标准化 ELISA 并进行验证，用来检测被咬动物中针对钝缘蜚唾液抗原的抗体。
- 9) 通过使用合适的血清学诊断和病毒学试验来识别/检测幸存猪，提高对幸存猪作为潜在排毒者的认识。
- 10) 研究低毒力分离株和持续感染的影响和检测

流行病学

在肯尼亚引进欧洲家猪之后，非洲猪瘟最早于 1909 在非洲首次报道。在家猪中以急性出血性临床症状为特征，死亡率达到 100% (Montgomery 等, 1921)。后来人们认识到，ASF 一直存在于非洲野生动物中 (Penrith 等, 2013)。非洲猪瘟在非洲的流行仍然是地方性的，并且每年都会有大量的 ASF 暴发病例（见表 1）。在非洲新感染的国家迅速形成地方性感染，例如，中非共和国、乍得和埃塞俄比亚 (Achenbach 等 2016)。

1957 年，ASF 经里斯本附近机场航班上的残羹冷炙首次传出非洲进入葡萄牙 (Costard 等, 2009; Gallardo 等 2015)。1978 年 ASFV 也通过相似的途径传入了巴西 (Lyra 2006)。在非洲大陆以外的国家中，除了意大利撒丁岛以外，所

有感染 ASFV 的国家都成功地根除了该病。但 2007 年 6 月，OIE 报道了高加索地区的格鲁吉亚爆发了非洲猪瘟疫情，此次疫情可能由于从非洲过来的船舶携带受 ASFV 污染的猪肉饲喂生猪引起的（Rowlands 等，2008）。此后，16 个国家报道了 ASF 的暴发，包括俄罗斯、东欧及波罗的海国家（Wozniakowski 等，2016；Nurmoja 等，2017）、波兰和比利时。在 2018 年 8 月，中国首次报道了 ASF 的暴发（见表 1）。

在 ASF 流行的国家、地区和大陆之间，ASFV 的流行病学可能存在很大差异。根据病毒在不同猪群之间的传播模式，ASF 的传播可分为两种循环：家猪循环和野猪循环（Costard 等，2009）。在感染地域是否存在节肢动物媒介（如软蜱）将影响病毒在环境中的传播和维持（Plowright 等，1994）。

在撒哈拉以南的非洲，ASFV 在疣猪和软蜱之间的丛林传播循环中传播。在非洲流行地区，被感染的蜱和疣猪是导致家猪疾病暴发的病毒来源。一旦传入家猪，病毒可高效地在家猪之间传播（Tulman 等，2009）。因没有观察到家猪和疣猪之间的直接接触传播（Costard 等，2009），所以 ASF 显示出与一组独特的风险因素相关联的特有的区域性表现模式，应该评估这些风险因素以建立适当的监测和控制策略。

在撒哈拉以南非洲国家的病毒分离株中已经鉴定出二十二种不同的 p72 基因型。然而，使用 p72 进行基因分型仅仅提供了初步的特征，并不直接提供基因型之间的交叉免疫或其毒性的数据。在非洲大陆以外，仅检测和分离到了属于西非的 P72 基因 I 型的毒株。然而，格鲁吉亚 2007 年的疫情以及随后在高加索地区发生的所有 ASF 疫情都归因于一种新的分离株，该分离株与东南非洲地区流行的 p72 基因 II 型有关。自那以来，ASF 已经蔓延到亚美尼亚、阿塞拜疆和俄罗斯联邦的邻国，抵达乌克兰边境，最近又传播到了中国这个世界上生猪最多的国家。2018 年在亚洲爆发的疫情证实，ASF 蔓延到非洲大陆以外国家的风险很高，而且对全球养猪业具有潜在的破坏性。

虽然 ASF 基因型在病毒生物学中的重要性尚不清楚，但它有助于我们了解 ASFV 的分布和进化，且对 ASF 流行区域内的持续性评估 ASF 具有重要作用。如最近在莫桑比克（Quembo 等，2017）、坦桑尼亚（Misinzo 等，2014）和埃塞俄比亚（Achenbach 等，2017）研究报告显示发现了新基因型。

根据目前可用的数据，可以绘制 ASFV 不同类型的全球分布如下：

- 西非（基因 I 型）
- 东非洲和中非（已知的所有基因型）
- 撒丁岛（基因 I 型）
- 高加索，俄罗斯，欧洲（基因 II 型）
- 中国（基因 II 型）

未知空白

ASFV 分离株的分子流行病学主要与野生种群和蜱类有关，这方面的知识仍比较匮乏。在撒哈拉以南的非洲流行地区，基于 PCR 的基因分型可能是有用的检测工具。然而，在新的地理区域发生疫情的情况下，唯一最重要的任务是完成病毒基因组的测序。这项工作不仅能够提供诸如病毒的潜在来源等基本信息，更能发现与其他毒株可能的同源性。

研究需求

- 1) 持续的分子流行病学研究监测圈养和野生猪群以及软蜱分布，这对于有效解决 ASFV 在流行地区的定位问题是必不可少的。这些研究对于预防和监测项目也是非常重要的。
- 2) ELISA 检测方法的建立以检测蜱中的病毒。
- 3) 需要加强非洲丛林传播循环中宿主的病毒检测、分离和鉴定，以用于基因分型。
- 4) 目前在非洲和欧洲的循环毒株的生物学特性和分子特征。
- 5) 鉴定和应用与病毒毒力相关的新系统发育标记物，以了解流行地区的病毒进化。

监测

家猪 ASF 的临床表现取决于流行病毒的毒力。家猪感染可导致多种形式临床症状，从高致命性的急性表现到亚临床症状的变化取决于感染病毒与宿主因素（Tulman 等，2009）。与家猪不同，感染 ASFV 的野猪一般无临床症状，病毒血症滴度低（Heuschele 和 Coggins 1969；Montgomery 1921；Plowright 1981；Thomson 1985）。ASF 这些临床表现特征与猪的其它疾病的临床特征相似，难以靠临床症状进行监测。鉴于 ASF 流行病学的复杂性和该病的多种临床表现，有必要开展基于诊断测试的监测活动。



未知空白

1) 监测是能够通过早期发现和遏制疾病暴发消除源头疾病的最重要的对策。然而，需要不同的监测策略来检测 ASFV 感染的不同临床表现。对于急性感染，监测活动可以基于临床体征；然而，对于轻度病例或慢性感染，通过临床症状诊断的可能性不大，监测活动必须基于实验室检测诊断，以补充基于临床症状的监测。

2) 被动监测常常是许多国家在经济上可行的唯一解决办法，但由于难以将 ASF 与经典猪瘟和可能呈现类似临床症状的其他常见猪地方性疫病区分开来，因此存在许多弱点。

3) 主动监测计划花费高昂，而且由于抗体检测的难点和缺陷，目前必须依赖直接检测病原的方法，如病毒分离和核酸检测。

4) 对于持续性感染，有效的监测将是困难和昂贵的，因为没有可以提高疑似病例筛选率的指征。监测活动可以基于猪群的死胎率或其他繁殖参数。然而，这样的指征可能缺乏特异性，以至于缺乏经济上的可行性。这类感染是综合 ASF 监测系统设计中的一个关键弱点。

研究需求

- 1) 在实验条件下评价目前可用的 ELISA 和 PCR 试验的性能和总体准确度。
- 2) 开发和评价新的检测方法，如用于抗原和抗体检测的 ELISA。
- 3) ASFV 亚型毒株的基因组测序的自动化和标准化。
- 4) 对感染性接触动物实验中不同毒力的 ASFV 毒株的传播速率进行评价。
- 5) 开发蜱虫中 ASFV 检测技术。
- 6) 在紧急控制计划中需要根据个体猪、畜群和区域内猪群统计（低密度与高密度猪群体）的水平对 ASF 的流行病学进行评估和建模。
- 7) 应进行流行病学调查，以执行紧急控制措施，并使用“诊断试验”来检测暴露群中的感染猪。
- 8) 需要对 ASFV 的控制或传播进行风险评估。

野生猪和野猪

野生猪和野猪可能在 ASF 的传播和维持中起重要作用。需要进一步研究以了解野生猪作为 ASF 储库的潜在作用。

蜱

有必要确定受影响区域（暴发 ASF 疫情的地区）的蜱是否可能成为病毒的生物学载体。关键研究包括确定新分离的 ASFV 毒株是否可以有效感染本地蜱，以及它们是否被持续感染。需要进一步研究了解软蜱的分布情况。

对策评估

设想

以下是 GARA 工作组为评估可能的应对措施提出的一些设想，以提高我们控制和根除 ASF 暴发的能力。

形势

评估应对最坏情况下的策略：在无 ASF 的国家的高密度养猪区中，有组织地有计划地将 ASFV 污染物散布至各个区域。

目标猪群

评估应对目标生猪生产环节的防控措施的优先次序：

- 1、散户
- 2、商业化育肥场（仔猪、保育猪和肥猪）
- 3、小规模猪场
- 4、大规模猪场
- 5、种猪场

发病范围

该防控策略评估的范围包括集体爆发 ASF 的散户，发病的各阶段仔猪、肥猪、母猪以及出现感染的野猪。

疫苗免疫

目前该病没有有效的疫苗，因此现阶段唯一的控制策略就是通过早期诊断，一旦发现感染动物立刻将其扑杀，同时严格限制猪群转运。

决策模型

GARA 探索小组通过定量 Kemper-Trego (KT) 决策模型评估了包括实验产品在内的可用的疫苗和诊断方法，并在 GARA 科学研讨会之前提供了使用该模型的说明（见附录 1）。工作组修改了模型中的标准和权重使其不但可用于评价防控策略同时还可用于评估实验性的 ASF 疫苗和诊断方法（见附录 2、3、4 和 5）。

标准

工作组选定了几个关键标准可用于比较不同防控方案的相关性和有效性，具体如下：

疫苗免疫

- 疫苗效力
- 安全性
- 一针的剂量
- 疫苗的量产速度
- 存储
- 分销/供应
- 大规模免疫
- DIVA 兼容性
- 停药期
- 实施成本（货物成本，更换成本，库存成本，管理成本）

诊断

- 敏感性
- 特异性
- 直接（抗原/DNA）检测，暴发期间的野毒和疫苗毒的检测
- 间接（抗体）检测，平时及疫情暴发后野毒抗体和疫苗抗体的监测
- 确诊
- 检测方法的量产速度
- 检测量

- 现场检测
- 快速出结果
- 需要进行验证试验
- 操作简便
- 存储/分配/供应
- 实施成本

权重

对每个标准进行加权，以便对所选干预措施的影响进行定量比较。

产品简介

为了确保能有一个可持续且有意义的评估，需要为每一个防控方案定制一个理想的方案简介（例如：标准检查程序）：

理想的疫苗标准

- 1、高效：疫苗可防止病毒扩散，适用于各个阶段的猪；包括受母源抗体影响的猪，免疫力可持续一年
- 2、弱毒苗毒力不返强，能确保所有免疫猪的安全；
- 3、仅需一次免疫
- 4、能迅速大规模量产并快速交付成品，同时具备高滴度的生产工艺
- 5、保质期应至少为 24 个月
- 6、具有较好的运输和储藏稳定性
- 7、起效快，7 天起效为最佳
- 8、野毒和疫苗毒的兼容性：可有效区分感染动物和免疫动物
- 9、停药期短
- 10、疫苗成本、应用成本及储藏成本

理想的检测方法标准

- 1、可用于检测所有 ASF 基因型
- 2、用于猪群防控及扑杀的直接检测法
- 3、用于亚临床病例监测或诊断后防控的间接检测法
- 4、用于早期诊断的快速检测法
- 5、特异性高于 95%

- 6、灵敏度高于 95%
- 7、可应用于现场检测
- 8、野毒和疫苗毒检测的兼容性
- 9、现场验证
- 10、操作简便
- 11、检测方法的可扩展性
- 12、合理的检测费用

评价标准

这些防控措施的评价标准是 ASF 工作组成员全体认定的最佳判定标准（见附录 2、3 和 4）。

疫苗

GARA 探索小组指出，目前进行 ASFV 的疫苗研究受限于全球范围内研究团队较少。表 2 中展示了在 2012-2018 期间同行评审的科学出版物中报道的关于 ASF 疫苗的研究汇总。迄今为止，基因缺失重组弱毒活疫苗是最有希望做成的疫苗。先前的研究已经发现了一些与毒力及免疫调节相关的基因，若能将这些基因敲除则可获得一个强有力的疫苗候选毒株。用弱毒株做疫苗是一个能确保具有良好保护性的方法。利用基因重组技术还可以在病毒基因组中插入适当的标记使其与野毒株进行区分，这在疫情爆发中尤其重要。目前，尚未有人分离到具有良好的安全性及免疫原性的弱毒株，但是在过去几年中，几个实验室已经取得了一些进展并且获得具有安全有效的弱毒株的可能性越来越大。亚单位疫苗与弱毒苗相比较而言，可以消除毒力返强的风险，同时亚单位苗可以确保安全性并可与野毒株进行区分。虽然先前的研究数据表明这种方案对于 ASFV 的感染并没有产生有效的保护，但目前正在进行的一些关于亚单位苗的研究显示出可行性。总的来说，在开发有效疫苗方面取得的进展和迄今取得的初步成果表明，第一代疫苗可能在不久的将来出现。

概述

目前仍然没有疫苗可以防控 ASF，但是在弱毒苗的研究和生产方面已经取得了进展。

实验疫苗的评估

GARA 探索小组讨论了不同的疫苗的特点，总结如下：

1) ASFV 基因缺失减毒活疫苗：通过缺失毒力基因的方法制备弱毒株。动物在免疫该缺失株 28 天后用该毒株的亲本毒株进行攻毒，免疫动物可较好的预防该病的感染。探索小组认为这类试验性疫苗的效力必须要包含以下四个方面：1 仅需一针免疫即可达到有效保护；2 能迅速并持续的诱导免疫反应；3 良好的安全性；4 可区分疫苗毒和野毒。尽管近期的研究结果显示这类疫苗在一些不同基因型的毒株中存在着交叉保护，但是缺乏异源保护仍然是这类疫苗的主要缺陷。

2) ASFV 基因重组亚单位疫苗：目前已经在不同种的疫苗载体上插入 ASFV 基因，例如，牛痘病毒载体、浣熊痘病毒载体、安卡拉病毒载体、猪痘病毒载体

和人腺病毒载体。这类疫苗的优点在于安全性高、激发免疫快、可建立DIVA标记物以区分野毒以及生产成本低。值得注意的是，除去近期的一份试验数据外，目前为止并没有试验可以证明由AFSV的单基因或者一组基因制备的亚单位疫苗可以保护家猪免受同源毒株的感染。因此，ASFV亚单位疫苗的研发需要更深入的研究来鉴定保护性抗原和抗感染的病毒结构。

3) ASFV DNA 疫苗：从技术上说 DNA 疫苗也是一种亚单位疫苗，这类疫苗是将 ASFV 基因重组到 DNA 载体中，然后以整个重组 DNA 载体作为一种疫苗抗原。GARA 探索小组的专家认为这类疫苗的最大优势在于它的安全性好以及可与野毒区分。与上文（2）中提到的蛋白亚单位疫苗一样，目前尚未成功筛选到可以用于制备 ASFV DNA 亚单位疫苗的基因。

根据以上评估，ASF 研究小组认为基于科学方法致弱的 ASFV 弱毒株来制备疫苗是最有希望的。尽管如此，ASF 研究小组认为这类疫苗仍然需要以下三个方面的大量基础实验进行评估，包括早期免疫的诱导、疫苗毒和野毒的区分以及防止毒力返强。

诊断

GARA 探索小组认为这类防控措施十分有效。ASF 的早期诊断对于最大限度地减少疾病传播以及降低经济损失非常重要。美国是通过主动和被动相结合的方式对 ASF 进行监测。在疫病暴发后的恢复阶段的诊断也是必不可少的。

总结

- 如发现疑似病例，应同时对抗原、抗体进行检测。
- 发病动物若存活，那么 ASFV 的抗体会在 7-10 天内出现。
- 发病动物在感染 2-3 天可检测到 ASF 病毒，病毒抗体可在体内持续很长一段时间。
- 该病的潜伏期通常为 3-15 天，强毒株会引起急性出血性疾病，其特征为高烧、食欲不振、皮肤和内脏器官出血，并且在 3-10 天内死亡，有时甚至在早期的临床症状出现之前便已死亡。

用于实验室和商业诊断测试的评估（见附录 3 和 4）。

ASF 工作小组确定并评估了六种诊断方法，主要用于监测、确诊和恢复饲养。

这些诊断方法可用于全球各个实验室中，还有一种试剂盒可在市场上买到。这些检测方法的可用价值可用“ASF 的防控及扑杀的检测方法标准”（参见决策模型，附录 1）标准进行评估。

1) 病毒分离 (VI)

利用原代猪巨噬细胞进行病毒分离是检测病毒感染的经典技术。通过红细胞吸附或细胞病变试验也可检测病毒感染。ASF 工作小组在附录 6 中强调了该技术的特点，包括特异性、敏感性及检测结果不需要再进一步确认的事实。但是，该技术的主要缺点为检测时间较长，无法对大量样本进行检测，检测机构难以掌握该技术，并且该检测方法需要较高的试验技能。

2) **常规 RT-PCR**。该技术主要利用特异性引物对保守区域 p72 进行扩增。该技术具有良好的特异性和灵敏度，检测的样本量大，出结果速度快。但是，该方法的结果需要一个认证技术的进行验证，并且该方法对试验技能有较高要求。

3) **实时 RT-PCR**。该方法具有良好的特异性，出结果速度快，检测机构易于掌握，并且对大量样本进行检测。与常规 PCR 一样，该结果需要进行验证，并且操作者必须具有执行该技术的专业知识。

4) **荧光抗体检测 (FAT)**。该检测方法利用 ASFV 的特异性荧光抗体来检测感染动物组织中的病毒，这个方法具有很高的特异性，出结果速度较快，结果可信且成本较低。该方法的主要缺点是不能大量检测，并且这个方法需要极高的试验技能。

5) **抗原 ELISA**。该方法的原理是利用抗 ASFV 抗体捕获病毒，虽然这个方法的敏感性不太好，但是特异性很强，可以一次检测大量样品，适用于批量检测。此外，这个方法操作简单，出结果速度快。这个方法的另一个缺陷就是结果准确性不高，需要其他技术验证结果，且成本昂贵。

6) **多重 PCR 测定**：多重 PCR 可用于同时检测 ASFV 和 CSFV (Agüero 等, 2004)。这个方法有很高的特异性和敏感性，并且已经通过临床和实验室的发病猪样品进行了验证。这种检测在临床怀疑猪出血性疾病时很有用。因为在那些国家/地区，这两种病毒可以随时共同传播。

实验室诊断试验的评估

GARA 探索小组确定并讨论了几种在实验室中用于检测 ASF 的新技术或用

于现场使用的检测方法。

1) 环介导等温扩增反应 (LAMP): LAMP 技术是一种基于核酸扩增的技术, 该技术不需要 PCR 仪。该技术仅需针对靶基因的 6 个区域设计 4 种特异引物, 在链置换 DNA 聚合酶的作用下即可进行 (Notomi 等, 2000)。LAMP 特异性高, 敏感性好, 肉眼即可观察到扩增结果。相对简单的操作要求使得 LAMP 技术适用于基层实验室、简易化实验室甚至是临床现场检测。近期的研究已经建立了数种 LAMP 的检测技术, 目前正在进行标准化试验和验证试验 (Hertjner 和 Allan, 英国)。

2) 通用探针库实时定量荧光 PCR 技术: UPL 是由罗氏公司商业化的一种水解短 DNA 探针库, 最初用于基因表达分析和通用检测系统。近年来, 该技术也用于抗原的检测。该技术的主要优势在于检测成本低, 检测时间短且可随时随地进行标准化检测。该技术仅需要一对特异性引物和一个合适的 UPL 探针库即可通过荧光定量 PCR 技术进行一次低成本的 ASFV 检测。针对不同的病毒基因组, 已经研发了两种标准化的可用于 ASFV 检测的 URL RT-PCR 检测方法 (Fernández-Pinero, Gallardo 和 Arias, 西班牙)。目前该方法的适用性验证试验正在进行中。

3) LATE-PCR: LATE-PCR 是一种能产生大量 ssDNA 分子的先进的不对称 PCR, 通过结合特定的低 T_m 探针进行检测。与目前广泛使用的 PCR 相比, 该方法具有多种优势, 例如它提高了多路复用的能力, 它的热循环更快 (Sánchez 等, 2004)。最近开发了用于 ASFV 检测的 LATE-PCR 方法 (Hakhverdyan, Stahl 和 Belák, 瑞士; 合作者 Ronish 和 Wangh, 美国)。LATE 技术由 Smiths Detection 独家授权, 其研发的 ASF 方法将应用于便携式 BioSeeq PCR 平台, 可以提供可靠的、功能强大的且易于使用的诊断系统, 应用于各种环境条件下 ASFV 的现场检测。

4) 侧向流动装置 LFD: 目前正在开发能够特异性检测血清样品中 ASF 抗体的一步免疫色谱条。该定性检测是基于直接免疫试验的, 其中检测试剂是用纯化的 ASFV 蛋白共价包被的乳胶微粒, 捕获试剂是吸附在硝酸纤维素膜条上可以形成测试线的病毒蛋白。通过将抗对照蛋白的抗体固定在测试线上生成的第二条线作为检测对照。血清样品就加在样品垫上。样品中的特异性抗体能特异性结合标记的微粒, 形成的抗体-蛋白质复合物通过毛细管作用迁移到硝酸纤维素膜上, 并与固定的病毒蛋白反应, 形成可见的测试线。

消毒剂

很多常用的消毒剂对该病毒无效，因此在消毒时需挑选对 ASFV 有用的消毒剂。次氯酸钠（家用漂白剂浓度为 5.25%）、碘制剂和季铵化合物是有效的消毒剂。

杀螨剂

杀螨剂对于软蜱防控可能没有效果，因为软蜱离开宿主后会钻入地下并生活在地下的缝隙中。防止 ASF 发生的最好方法就是将猪群迁出有软蜱存在过的场地。

药物

目前没有批准可以用于治疗 ASF 的猪用抗病毒药物。

个人防护装备（PPE）

ASF 不是人畜共患病。PPE 主要适用于防止参与扑杀该病的卫生官员将病毒传播到其他猪场。

建议

研究

GARA 建议实施以下研究重点，以提高我们快速检测、控制和应对 ASF 暴发的能力，包括在地方性流行环境中逐步控制和根除 ASF。

病毒学

- ASFV 完整基因组序列：完成各基因型、不同毒力病毒以及在家猪，野猪和蜚中复制的病毒的全基因组测序。
- 建立一个 ASFV 生物信息学资源综合数据库，包含大量分离株的全基因组序列，以取代目前意义不大的基于基因型的分类。

病毒发病机制

- 调控宿主之间（包括家猪和野猪以及昆虫宿主）相互感染的基本参数。
- 研究不同毒力 ASFV 分离株在不同的易感宿主中的发病机制。
- 确定免疫相关宿主基因的激活模式，尤其是感染的早期阶段。
- 明确涉及宿主范围、毒力和致病性的 ASFV 基因和决定簇（多基因家族基因群）。
- 追踪影响不同基因型和不同 ASFV 毒株之间毒力差异的决定因素

免疫学

- 发现介导对抗病毒感染的有效同源和异源保护的免疫机制。
- 鉴定是否存在与同源和异源保护相关的病毒遗传模式。
- 鉴定参与诱导保护性免疫应答的病毒蛋白。
- 识别涉及促炎性细胞因子和抗体产生相关的调节基因，并评估它们在病毒感染/毒力变化过程中的实际作用。
- 探索基于细胞免疫的新检测方法，以便早期诊断。
- 提高对多基因家族在抗原变异和免疫逃避中作用的认识。
- 识别和鉴定与宿主保护相关的基因。

流行病学

- 需要建立一个全球 ASF 监测系统，以提供有关 ASF 风险的高质量、准确和实时的信息，填补全球 ASF 形势的关键信息空白，并支持在全球范围内的 ASF 的控制和根除活动。
- 继续进行分子流行病学研究，监测圈养和野生猪群以及软蜱的分布，这不仅有利于有效解决 ASFV 在流行地区的定位，也有利于 ASF 的预防和监测。
- 研发用于检测蜱存在的 ELISA。
- 需要加强对非洲丛林传播循环宿主中病毒的检测、分离和鉴定，以用于基因分型。
- 对非洲和欧洲目前流行的分离株进行分子生物学鉴定。
- 鉴定和应用与病毒毒力相关的新的系统发育标记，以了解流行地区病毒的进化。

监测

- 在实验条件下评估当前可用的 ELISA 和 PCR 方法的性能和整体精度。
- 开发和评估用于抗原和抗体检测的新方法（例如 ELISA）。
- ASFV 毒株亚型基因组测序的自动化和标准化。
- 评估接触感染动物实验中不同毒力 ASFV 毒株的传播速率。
- 研发用于检测蜱体内 ASFV 的检测方法。
- 在紧急控制计划中需要根据个体猪、畜群和区域内猪群统计（低密度与高密度猪群体）的水平对 ASF 的流行病学进行评估和建模。
- 应进行流行病学调查，以执行紧急控制措施，并使用“诊断试验”来检测暴露群中的感染猪。
- 需要对 ASFV 的控制或传播进行风险评估

诊断

- 现场检测新技术的研发
- 评估和验证商品化的现场检测技术，以实现快速地监测、确诊和恢复饲养。
- 确定/开发替代原代细胞的细胞系，以改进病毒分离技术。

- 全面验证新型或改进型 ELISA 方法用于检测替代样品（例如血液、组织渗出物、唾液样本、肉汁、滤纸等）中的抗体。
- 提高商品化诊断试剂盒（分子病毒学和血清学检测）中试剂的稳定性，以解决运输和过期问题。这可以通过探索不同的策略来解决，例如冻干等。
- 考虑到世界范围内的情况，扩大新技术的现场验证。
- 开发和评估用于野猪的非侵入性采样方法。
- 批准可用的现场诊断工具，加强非洲野生动物的检测和监测。
- 开发、评估并现场验证商品化血清学检测方法。
- 规范和验证用于检测被咬动物体内针对钝缘蜚唾液抗原抗体 ELISA 方法。
- 通过使用适当的血清学和病原学诊断试验来识别/检测幸存猪，提高了对幸存猪作为潜在排毒对象的认识。
- 研究低毒力毒株和持续感染的检测及影响。

疫苗

- 根据 ASFV 病毒学和功能基因组学开展疫苗研发。
- 确定实验减毒活疫苗的安全性。
- 鉴定肺泡巨噬细胞中促使 ASFV 生长的基因，为用于疫苗生产的细胞系的开发提供指导。
- 设计基因缺失的 ASFV 作为潜在的候选疫苗。

生物治疗

- 测试腺病毒 5 型表达的干扰素在猪体内的分布和表达，用于快速预防 ASFV 感染。

消毒剂

- 开发低成本商用消毒剂，用于灭活农场和其他易感环境中污染物表面的非洲猪瘟病毒。

给药方式

- 开发诱饵，以便对野猪进行有效的口服疫苗免疫

- 开发和验证有效的活疫苗注射免疫途径
- 测试用于投递新型 ASF 分子疫苗的无针系统。

野生猪和野猪

- 开展研究项目，以进一步了解野生猪和野猪作为 ASF 储库的潜在作用。

蜱媒

- 确定新暴发 ASF 疫情的地理区域内的蜱是否有可能成为病毒的生物学载体。
- 确定新的 ASFV 分离株是否能有效感染当地的蜱，是否会发展成持续感染。
- 需要进一步研究了解软蜱的分布。

灾备

本报告中讨论的许多对策都需要准备并整合到调整过的疾病控制计划中，并为用于 ASF 暴发的应急响应计划储备资金。GARA 建议投资实施“研究重点”，以支持灾备计划，并确保预防、控制和根除 ASF 对策的有效使用。

结 论

非洲猪瘟是一种威胁当今全球养猪业生产的跨界动物疾病。虽然 ASF 是一种非洲的疾病，但它现在已经根植于高加索、俄罗斯、欧洲，且正在威胁着亚洲。导致近来这种地理分布的最重要原因很可能是动物、贸易以及带毒产品的非法流动。这使得包括欧洲、南美洲和北美洲国家在内的其他从事猪和猪产品贸易的国家处于危险之中。此外，ASF 在新的地理生态中暴发的流行病学影响尚不清楚，这使得 ASF 的控制措施复杂化。监测计划将成为防控 ASF 的第一道防线。已建立多种诊断试验方法，须将其纳入实验室诊断。疫苗是一项关键的控制措施，但目前无法获得，这使得所制定的应对非洲猪瘟暴发的防控对策在可行性方面存在重大缺陷。

图

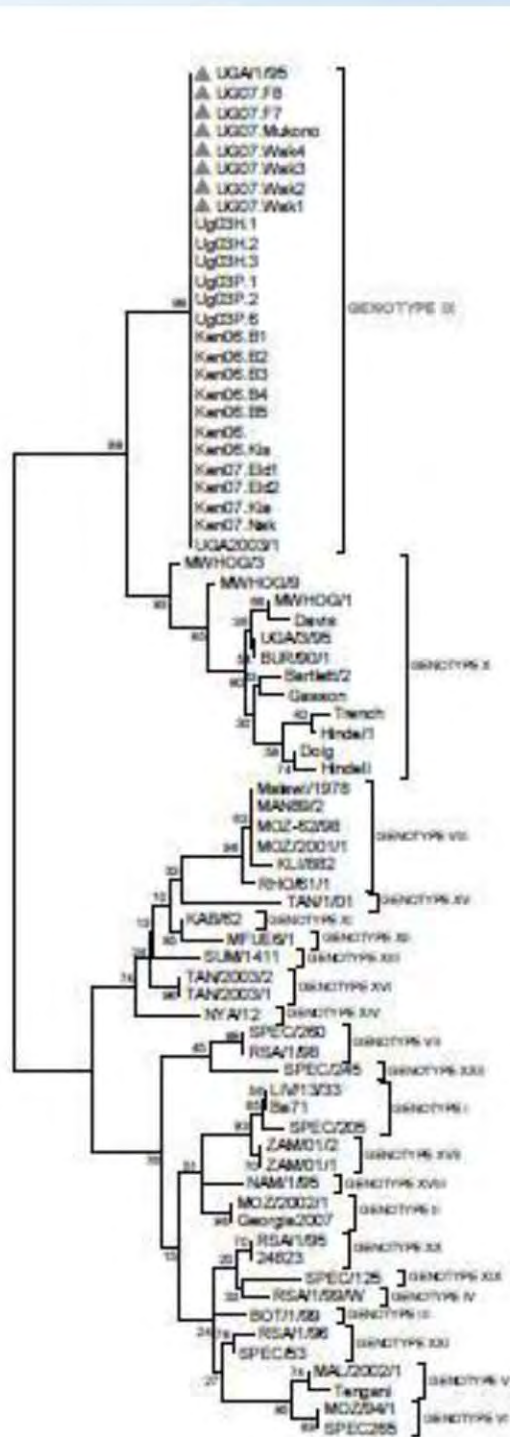


图 1: 基于 p72 基因分型的 22 种 ASF 基因型系统发育树, 揭示了 ASF 病毒的多样性 (由 Carmina Gallardo 提供)

表 1：2017-218 年 ASF 疫情

国家	最新 ASF 疫情	来源
比利时	2018 年 9 月	https://www.globalmeatnews.com/Article/2018/09/14/African-Swine-Fever-reaches-Belgium
中国	2018 年 8 月	www.thepigsite.com
罗马尼亚	2018 年 8 月	https://www.brownsvilleherald.com
马拉维	2018 年 7 月	outbreaknewstoday.com/Malawi
拉脱维亚	2018 年 8 月	https://eng.lsm.lv/article/.../massive-outbreak-of-swine-fever-in-western-latvia.a28740...
匈牙利	2018 年 4 月	https://www.pigprogress.net/Health
南非	2018 年 3 月	https://www.reuters.com
坦桑尼亚	2018 年 3 月	www.xinhuanet.com
摩尔多瓦	2018 年 3 月	https://www.moldpres.md/en/news/2018/05/12/18003882
科特迪瓦	2018 年 2 月	https://www.oie.int
波兰	2018 年 1 月	https://www.pigprogress.net
乌干达	2018	Charles Masembe personal communication
赞比亚	2018	https://www.farmersweekly.co.za
肯尼亚	2018	https://www.nation.co.ke › Business › Seeds of Gold
加纳	2018	www.thepigsite.com
爱沙尼亚	2017 年 12 月	www.fao.org/fileadmin/user_upload/reu/europe/documents/.../ASF.../3_estonia.pdf
白俄罗斯	2017 年 11 月	https://www.pigprogress.net/.../Belarus-independent-media-report-ASF-outbreaks-208...
立陶宛	2017 年 7 月	www.xinhuanet.com/english/2017-07/14/c_136442000.htm
捷克共和国	2017 年 6 月	www.izs.it
西伯利亚	2017	https://wwwnc.cdc.gov/eid
俄罗斯	2017 (自 2007 以来)	www.thepigsite.com
乌克兰	2017 (自 2007 以来)	www.thepigsite.com
莫桑比克	2016	https://allafrica.com/stories/201608291332.html

多哥	2016	www.xinhuanet.com/english/2016-06/26/c_135466133.htm
佛得角	2015	www.thepigsite.com
津巴布韦	2015	https://www.wattagnet.com
贝宁	2013	https://www.pigprogress.net/.../Outbreak-of-African-Swine-Fever-in-Benin-1405443...
乍得	2014	https://www.wattagnet.com/.../20071-chad-has-first-african-swine-fever-outbreak-sinc...
亚美尼亚	2011	https://www.pigprogress.net/.../African-Swine-Fever-outbreaks-in-Armenia-PP004563W...
安哥拉	2011	www.healthmap.org/site/diseasedaily/article/african-swine-fever-angola-12611
喀麦隆	2011	https://www.pigprogress.net/.../African-Swine-Fever-hits-Cameroon-100000-animals-co...
马达加斯加	2010	Charles Masembe personal communication
刚果民主共和国	2010	Charles Masembe personal communication
纳米比亚	2009	https://www.pigprogress.net/
尼日利亚	2009	
阿塞拜疆	2008	www.today.az/view.php?id=42715
格鲁吉亚	2007	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2634662/
毛里求斯	2007	https://www.pigprogress.net/.../African-Swine-Fever-outbreak-in-Mauritius-PP000994W...
塞内加尔	2007	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3204638/
冈比亚	2007	www.africanagriculture.co.zw/2007/08/swine-fever-hits-gambia.html

表 2：NCBI 收录的 ASF 全基因组序列信息摘要

毒株名称	收录号	时间	国家	宿主
Odintsovo_02/14	KP843857.1	2014	俄罗斯	野猪
26544/OG10	KM102979.1	2010	意大利：撒丁岛	家猪
47/Ss/2008	KX354450.1	2008	意大利撒丁岛萨萨里省	家猪
Georgia 2007/1	FR682468.1	2007	格鲁吉亚	家猪
Ken06.Bus	KM111295.1	2006	肯尼亚	家猪
Ken05/Tk1	KM111294.1	2005	肯尼亚	蜚
OURT 88/3	AM712240.1	1988	葡萄牙阿连特茹	蜚
Pretorisuskop/96/4	AY261363	1996	南非：克鲁格国家公园	蜚
Malawi Lil-20/1	AY261361	1983	马拉维卡拉斯瓦	蜚
Mkuzi 1979	AY261362.1	1979	南非：Mkuze 禁猎区	蜚
BA71V	NC_001659.2 U18466.2	1971	西班牙	Vero 适应株
NHV	KM262846	1968	葡萄牙	家猪
Tengani 62	AY261364	1962	马拉维	家猪
L60	KM262844	1960	葡萄牙	家猪
Kenya 1950	AY261360	1950	肯尼亚	家猪
E75	FN557520.1	1975	西班牙	家猪
warthog	AY261366.1	2003 之前	纳米比亚	疣猪
warmbaths	AY261365	2003 之前	南非	蜚
Benin 97/1	AM712239.1	1997	贝宁	家猪

表 3：ASF 实验性质疫苗

疫苗种类	参考文献	保护性	安全性
亚单位疫苗	J Virol. 2018 pii: JVI.02219-179	无	有
减毒活疫苗	Vaccine. 2018 36:707-715	有	未进行试验
减毒活疫苗	J Virol. 2017 91(24). pii: e01428-17	有	未进行试验
减毒活疫苗	J Virol. 2017 91(21). pii: e01058-17	有	未进行试验
减毒活疫苗	Arch Virol. 2017 (10):3081-3088	有	未进行试验
亚单位疫苗	PLoS One. 2017 12(5): e0177007	未进行试验	有
亚单位疫苗	Vet Immunol Immunopathol. 2017 Mar;185:20-33	未进行试验	有
减毒活疫苗	Antiviral Res. 2017 138:1-8	有	无
减毒活疫苗	J Virol. 2016 91(1). pii: e01760-16	有	未进行试验
减毒活疫苗	Viruses. 2016 8(10). pii: E291	有	未进行试验
亚单位疫苗	Clin Vaccine Immunol. 2016 23(11):888-900	未进行试验	有
减毒活疫苗	Vaccine. 2016 34(39):4698-4705	有	未进行试验
减毒活疫苗	Virus Res. 2016 Aug 2;221:8-14	无	有
减毒活疫苗	J Gen Virol. 2015 96(Pt 4):866-73.	有	未进行试验
减毒活疫苗	J Virol. 2015 89(16):8556-66	有	无
减毒活疫苗	J Virol. 2015 89(11):6048-56	有	未进行试验
减毒活疫苗	Transbound Emerg Dis. 2016 63(5):e323-7	有	无
亚单位疫苗	Vaccine. 2014 Jun 30;32(31):3879-82	无	有
减毒活疫苗	Virology. 2013 Aug 15;443(1):99-105	无	未进行试验
亚单位疫苗	Antiviral Res. 2013 98(1):61-5	无	有
亚单位疫苗	PLoS One. 2012;7(9):e40942	无	有

附录 1 应对措施工作组说明

决策模型

我们将使用一个决策模型来评估潜在的应对储备。这些对策应该能显著提高我们在诸如美国等无 ASF 国家爆发 ASF 后控制和根除非洲猪瘟 (ASF) 的能力。决策模型是一个简单的工具，它将使我们关注国家兽药储备的关键标准，并对现有的干预措施进行相对排序。决策模型可作为 Excel 使用，它可以定量地评估我们分配给每组选择标准的排名，这些标准将导致选择最高的累积选项。我们可以使用我们想要的标准，但我们的目标是去决定那些会成功或成功的人。每个干预的标准将由 ASF 决策工作组选择，现在已经确定了一个初步的设置来加速该过程。我们鼓励您在参加会议之前审查这些标准，并准备根据需要与工作组一起修改这些标准。

下面提供了评估疫苗的标准和例子。

标准

如果疫苗将被用作 ASF 暴发的紧急控制手段，那么我们需要知道：（1）它是否有效（它是否有效地阻止病毒的散毒还是仅仅通过已知的尺度减少了病毒的散毒）；（2）它是否可以仅靠单次免疫就能快速产生保护（可能没有二次免疫的时间）；（3）可靠及快速的生产过程目前是否可行（需要知道它能够快速启动和运行，并将生产出可估量的疫苗）；（4）能否快速安全地将产品送到疫情现场；（5）一旦疫苗到达现场，能否实现快速免疫；（6）给药类型——群体免疫或注射，工作人员和设备对于这项工作都非常重要；（7）有无可以成功监测和免疫动物的诊断方法。虽然成本很重要，但在 ASF 爆发场所，与其他费用相比，疫苗的成本相对较小。此外，产品的生产速度很重要，因为这将直接影响产品所需的库存量。因此，您将从以下为疫苗准备的 Excel 表单中看到我们提出的关键标准和每个标准的权重分配。

权重	关键标准
10	有效性
6	安全性
8	单剂量
6	扩大速度
2	保质期
2	分布/供给
10	快速产生免疫
8	免疫动物兼容
2	休药期
2	实施成本

Cyril Gerard Gay, DVM, Ph.D

Senior National Program Leader 首席科学家

Animal Production and Protection 动物生产和保护组织

Agricultural Research Service 农业研究局

附录 2 实验性质疫苗

非洲猪瘟主要实验性疫苗						
对每一个干预因素（2, 4, 6, 8 或 10）的重要性进行等级排序，只允许一个等级“10”						
权重	关键标准	重组基因缺失疫苗	重组痘病毒载体疫苗	重组猪痘病毒载体疫苗	DNA 疫苗	
10	有效性	10	4	4	2	
8	安全性	8	8	4	10	
8	单剂量	8	6	6	2	
8	交叉保护	2	2	2	2	
10	免疫启动	6	6	6	2	
4	分布/供给	8	8	8	8	
6	群体免疫	8	8	8	4	
6	免疫持续时间	8	6	6	4	
8	免疫动物兼容性	8	8	8	8	
6	保质期	6	6	6	8	
6	实施成本	4	8	6	4	

在每一个标准上排列 2, 4, 6, 8 或 10 的等级——不允许存在超过两个等级 10。

关键标准	重组基因缺失疫苗	重组痘病毒载体疫苗	重组猪痘病毒载体疫苗	DNA 疫苗	
有效性	100	40	40	20	
安全性	64	64	32	80	
单剂量	64	48	48	16	
交叉保护	16	16	16	16	
免疫启动	60	60	60	20	
分布/供给	32	32	32	32	
群体免疫	48	48	48	24	
免疫持续时间	48	36	36	24	
免疫动物兼容性	64	64	64	64	
保质期	36	36	36	48	
实施成本	24	48	36	24	
价值	556	492	448	368	

主要指标

疫苗简介

- 1、高效性：预防传播；对所有年龄猪有效，交叉保护所有 ASF 病毒株；快速启动免疫；一年免疫期，一次注射。
- 2、各龄猪的安全性；活疫苗无毒力反强

- 3、免疫动物兼容
- 4、生产方法能实现高滴度生产
- 5、大规模接种疫苗代替个体猪接种
- 6、快速生产规模化
- 7、合理成本
- 8、对于食品，休药期短
- 9、保质期长
- 10、分配和供应（取决于稀释剂和冷冻机与冷藏空间的需要）
- 11、实施成本、商品成本、管理成本、仓储成本

附录 3 监测用诊断方法

监测：非洲猪瘟的商业性和参考诊断										
对每一个干预因素（2,4,6,8 或 10）的重要性进行等级排序，只允许一个等级“10”										
权重	关键标准	ELISA K3	ELISA OIE	IB-test	IIF test	rtimePCR-King	PCR AGUERO	VI	DIF	Antifen ELISA K2
8	敏感性	8	8	10	8	6	8	8	6	2
10	特异性	8	6	6	8	8	8	10	8	8
10	目的验证	8	8	8	6	8	10	8	8	2
6	可扩展性速度	8	6	2	4	8	8	2	4	8
6	吞吐量	8	6	2	2	8	6	2	2	8
2	现场检测	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	快速结果	8	8	8	8	8	8	2	8	8
8	确定性结果	2	2	8	8	4	4	8	8	2
6	易于执行	8	8	8	4	6	6	2	4	8
6	专业知识	10	8	6	2	4	4	2	2	10
4	实施成本	2	10	4	8	4	6	6	8	2

在每一个标准上排列的 2,4,6,8 或 10 等级——不允许存在超过两个等级 10。

关键标准	ELISA K3	ELISA OIE	IB-test	IIF test	rtimePCR-King	PCR AGUERO	VI	DIF	Antifen ELISA K2
敏感性	64	64	80	64	48	64	64	48	16
特异性	80	60	60	80	80	80	100	80	80
目的	80	80	80	60	80	100	80	80	20

验证									
可扩展性速度	48	36	12	24	48	48	12	24	48
吞吐量	48	36	12	12	48	36	12	12	48
现场检测	0	0	0	0	0	0	0	0	0
快速结果	48	48	48	48	48	48	12	48	48
确定性结果	16	16	64	64	32	32	64	64	16
易于执行	48	48	48	24	36	36	12	24	48
专业知识	60	48	36	12	24	24	12	12	60
实施成本	8	40	16	32	16	24	24	32	8
价值	500	476	456	420	460	492	392	424	392

监测的主要测定标准:

诊断试验组合表

- 1、检测所有的 ASFV 分离株
- 2、直接和间接测试
- 3、特异性 > 95%
- 4、> 95% 灵敏度
- 5、证实
- 6、快速测试
- 7、易于执行
- 8、可升级
- 9、合理成本
- 10、现场检测
- 11、专业知识

附录 4 应对疫病暴发时的诊断方法

爆发：非洲猪瘟的商业性和参考诊断										
对每一个干预因素（2,4,6,8 或 10）的重要性进行等级排序，只允许一个等级“10”										
权重	关键标准	ELISA K3	ELISA OIE	IB-test	IIF test	rtimePCR-King	PCR AGUERO	VI	DIF	Antifen ELISA K2
10	敏感性	8	8	10	8	8	8	8	6	2
8	特异性	8	6	6	8	8	8	10	8	8
8	目的验证	8	8	8	6	8	10	8	8	2
8	可扩展性速度	8	6	2	4	8	8	2	4	8
8	吞吐量	8	6	2	2	8	6	2	2	8
2	现场检测	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	快速结果	8	8	8	8	10	8	2	8	8
6	确定性结果	2	2	8	8	4	4	8	8	2
6	易于执行	8	8	8	4	6	6	2	4	8
8	专业知识	10	8	6	2	4	4	2	2	6
4	实施成本	2	10	4	8	4	6	6	8	2

在每一个标准上排列的 2,4,6,8 或 10 等级——不允许存在超过两个等级 10。

关键标准	ELISA K3	ELISA OIE	IB-test	IIF test	rtimePCR-King	PCR AGUERO	VI	DIF	Antifen ELISA K2
敏感性	80	80	100	80	80	80	80	60	20
特异性	64	48	48	64	64	64	80	64	64
目的	64	64	64	48	64	80	64	64	16

验证									
可扩展性速度	64	48	16	32	64	64	16	32	64
吞吐量	64	48	16	16	64	48	16	16	64
现场检测	0	0	0	0	0	0	0	0	0
快速结果	80	80	80	80	100	80	20	80	80
确定性结果	12	12	48	48	24	24	48	48	12
易于执行	48	48	48	24	36	36	12	24	48
专业知识	80	64	48	16	32	32	16	16	48
实施成本	8	40	16	32	16	24	24	32	8
价值	564	532	484	440	544	532	376	436	424

监测的主要测定标准:

诊断试验组合表

- 1、检测所有的 ASFV 分离株。
- 2、直接和间接测试
- 3、特异性>95%
- 4、>95%灵敏度
- 5、证实
- 6、快速测试
- 7、易于执行
- 8、可升级
- 9、合理成本
- 10、现场检测
- 11、专业知识

附录 5 监测用实验室诊断方法

监测：非洲猪瘟的实验诊断						
对每一个干预因素（2,4,6,8 或 10）的重要性进行等级排序，只允许一个等级“10”						
权重	关键标准	HT-rELISA	p30-rIB	HT-rIB	IPT test	Fast rtimePCR-King
8	灵敏度	10	8	8	8	8
10	特异性	8	10	10	8	8
10	目的验证	8	8	8	6	8
6	可扩展性速度	8	2	2	4	8
6	吞吐量	8	2	2	2	10
2	现场检测	0	0	0	0	0
6	快速结果	6	8	8	8	8
8	确定性结果	2	8	8	8	6
6	易于执行	6	8	8	4	8
6	专业知识	6	8	8	2	4
4	实施成本	4	2	2	8	4

在每一个标准上排列的 2,4,6,8 或 10 等级——不允许存在超过两个等级 10。

关键标准	HT-rELISA	p30-rIB	HT-rIB	IPT test	Fast rtimePCR-King
灵敏度	80	64	64	64	64
特异性	80	100	100	80	80
目的验证	80	8	80	60	80
可扩展性速度	48	12	12	24	48
吞吐量	48	12	12	12	60
现场检测	0	0	0	0	0
快速结果	36	48	48	48	48
确定性结果	16	64	64	64	48
易于执行	36	48	48	24	48
专业知识	36	48	48	12	24
实施成本	16	8	8	32	16
价值	476	484	484	420	516

监测的主要测定标准：

诊断试验组合表

- 1、检测所有的 ASFV 分离株。
- 2、直接和间接测试
- 3、特异性 > 95%

- 4、>95%灵敏度
- 5、证实
- 6、快速测试
- 7、易于执行
- 8、可升级
- 9、合理成本
- 10、现场检测
- 11、专业知识

附录 6 应对疾病爆发的实验诊断学

爆发：非洲猪瘟的实验诊断						
对每一个干预因素（2,4,6,8 或 10）的重要性进行等级排序，只允许一个等级“10”						
权重	关键标准	HT-rELISA	p30-rIB	HT-rIB	IPT test	Fast rtimePCR-King
10	灵敏度	10	10	10	8	8
8	特异性	8	8	8	8	8
8	目的验证	8	8	8	6	8
8	可扩展性速度	8	2	2	4	8
8	吞吐量	8	2	2	2	8
2	现场检测	0	0	0	0	0
10	快速结果	8	8	8	8	10
6	确定性结果	6	8	8	8	6
6	易于执行	6	8	8	4	8
8	专业知识	6	8	8	2	4
4	实施成本	4	2	2	8	4

在每一个标准上排列 2,4,6,8 或 10 的等级——不允许存在超过两个等级 10。

关键标准	HT-rELISA	p30-rIB	HT-rIB	IPT test	Fast rtimePCR-King
灵敏度	100	100	100	80	80
特异性	64	64	64	64	64
目的验证	64	64	64	48	64
可扩展性速度	64	16	16	32	64
吞吐量	64	16	16	16	64
现场检测	0	0	0	0	0
快速结果	80	80	80	80	100
确定性结果	36	48	48	48	36
易于执行	36	48	48	24	48
专业知识	48	64	64	16	32
实施成本	16	8	8	32	16
价值	572	508	508	440	516

监测的主要测定标准：

诊断试验组合表

1、检测所有的 ASFV 分离株

- 2、直接和间接测试
- 3、特异性>95%
- 4、>95%灵敏度
- 5、证实
- 6、快速测试
- 7、易于执行
- 8、可升级
- 9、合理成本
- 10、现场测验
- 11、专业知识

附录 7 作出贡献人员

Marisa Arias, Ph.D

Director

Animal Health Research Centre -Centro de Investigación en Sanidad Animal-

EU Reference Laboratory for African Swine Fever

FAO Reference Centre for African Swine Fever

Instituto Nacional de Investigación y Tecnología

Agraria y Alimentaria (INIA-CISA),

Valdeolmos, 28130, Madrid, SPAIN.

Tel: +34 916202300

Fax:+34 916202247

e-mail: arias@inia.es

Manuel V. Borca, D.V.M., Ph.D

Foreign Animal Disease Research Unit

Plum Island Animal Disease Center

Agricultural Research Service (ARS)

United States Department of Agriculture (USDA)

P.O. Box 848 Greenport, NY 11944, USA

Tel. (631) 323 3135

Fax: (631) 323 3006

E-mail: manuel.borca@ars.usda.gov

Bruce Carter, DVM

Global Vaccine Manager

Center for Veterinary Biologics

Licensing and Policy Development

Animal and Plant Inspection Services (APHIS)

United States Department of Agriculture (USDA)

510 S. 17th Street, Suite 104, Ames, IA 50010 USA

Tel (515) 232-5785 Ext. 141

Fax (515) 232-7120

E-mail: bruce.carter@aphis.usda.gov

Consuelo Carrillo, DVM, PhD

Senior Animal Health Advisor

DSS-FADDL-STATS-VS-NVSL

APHIS-USDA

PIADC, PO Box 848, Greenport

11944 NY

E-mail: Consuelo.Carrillo@aphis.usda.gov

Dave Chapman, Ph.D

ASF Virus group Institute for Animal Health, Pirbright Laboratory Ash Road,
Pirbright, Woking Surrey, GU24 0NF, UK Tel : +44 (0)1483 231084 (Direct Line) E-
mail: Dave.chapman@bbsrc.ac.uk

Cyril Gerard Gay, DVM, Ph.D

Senior National Program Leader
Animal Production and Protection
Agricultural Research Service
United States Department of Agriculture
cyril.gay@ars.usda.gov

Doug Gladue, Ph.D

Foreign Animal Disease Research Unit
Plum Island Animal Disease Center
Agricultural Research Service (ARS)
United States Department of Agriculture (USDA)
P.O. Box 848 Greenport, NY 11944, USA
Tel. (631) 323 3135
Fax: (631) 323 3006
E-mail: manuel.borca@ars.usda.gov

Prof. Carlos Martins, DVM, Ph.D

Coordinator ASFRISK
Office C4-102
Faculdade de Medicina Veterinária
Av. da Universidade Técnica
1300-477 Lisboa, Portugal
cmartins@fmv.utl.pt

Denis Kolbasov, Ph.D, DVM Director, Russian National Institute of Veterinary
Virology and Microbiology Pokrov Vladimir region, Russia 601120 Tel/Fax +7-
49243-62125 denvk@land.ru

Prof. Chris Upton, Ph.D Biochemistry and Microbiology University of Victoria,
Canada Victoria, BC Research page: www.virology.ca Home page:
www.virology.ca/node/333
E-mail : cupton@uvic.ca

Richard Bishop, Ph.D

Senior Molecular Biologist
International Livestock Research Institute (ILRI)

PO Box 30709, Old Naivasha Road
Nairobi 00100, Kenya
Telephone: 254 20 422 3000 (switchboard) 422 3359 (direct line)
Fax: 254 20 422 3001
Mobile telephone: 0710 831 851
E-mail : r.bishop@cgiar.org

Dr. Marta Martinez Aviles, UCM-CISA
Universidad Complutense, Facultad de Veterinaria
Avda. Puerta de Hierro
28040 Madrid, Spain
and , Centro de Investigación en Sanidad Animal – Animal Health Research Center-
(CISA)
Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA)
Valdeolmos, 28130
Madrid, Spain
Tel. +3491602300
marta@sanidadanimal.info

Dr. Carmina Gallardo Frontaura
Laboratory Coordinator
EU- Community Reference Laboratory for African Swine Fever
Centro de Investigación en Sanidad Animal – Animal Health Research Center-
(CISA)
Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA)
Valdeolmos, 28130
Madrid, Spain
Tel. +3491602300
gallardo@inia.es

Dr. Pedro José Sánchez-Cordón,
Fac. Veterinaria, University of Cordoba, Spain
an2sacop@uco.es

Isabel Mínguez Tudela, DVM, Ph.D
Scientific Officer
Directorate General Research
European Commission
Office SDME 8/96
1049 Brussels
BELGIUM
Tel 32 2 299 21 09
Cel 32 479 425 488
Fax 32 2 296 30 29

Isabel.minguez-tudela@ec.europa.eu

Prof. Fernando Boinas,
Universidad de Lisboa
E-mail: fboinas@fmv.utl.pt

附录 8 参考文献

- Abworo EO, Onzere C, Oluoch Amimo J, Riitho V, Mwangi W, Davies J, Blome S, Peter Bishop R. (2017) Detection of African swine fever virus in the tissues of asymptomatic pigs in smallholder farming systems along the Kenya-Uganda border: implications for transmission in endemic areas and ASF surveillance in East Africa. *J Gen Virol*. 98 (7):1806-1814.
- Abrams CC., Goatley L, Fishbourne E, Chapman D, Cooke L, Oura CA, Netherton CL, Takamatsu HH, Dixon LK. (2013). Deletion of virulence associated genes from attenuated African swine fever virus isolate OUR T88/3 decreases its ability to protect against challenge with virulent virus. *Virology*. 2013 443(1):99-105. doi: 10.1016/j.virol.2013.04.028.
- Achenbach JE, Gallardo C, Nieto-Pelegrín E, Rivera-Arroyo B, Degefa-Negi T, Arias M, Jenberie S, Mulisa DD, Gizaw D, Gelaye E, Chibssa TR, Belaye A, Loitsch A, Forsa M, Yami M, Diallo A, Soler A, Lamien CE, Sánchez-Vizcaíno JM. (2017) Identification of a New Genotype of African Swine Fever Virus in Domestic Pigs from Ethiopia. *Transbound Emerg Dis*. 64(5):1393-1404.
- Afonso CL, Alcaraz C, Brun A, Sussman MD, Onisk DV, Escribano JM, Rock DL (1992) Characterization of p30, a highly antigenic membrane and secreted protein of African swine fever virus. *Virology* 189:368–373
- Afonso CL, Piccone ME, Zaffuto KM, Neilan JG, Kutish GF, Lu Z, Balinsky CA, Gibb TR, Bean TJ, Zsak L, Rock DL (2004) African swine fever virus multigene family 360 and 530 genes affect host interferon response. *J Virol* 78:1858–1864
- Agüero, M, Fernández, J, Romero, L, Zamora, MJ, Sánchez, C, Belák, S, Arias, M, Sánchez-Vizcaíno JM (2004) 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* 35:551–563
- Alcami A, Angulo A, Lopez-Otin C, Munoz M, Freije JM, Carrascosa AL, Viñuela E (1992) Amino acid sequence and structural properties of protein p12, an African swine fever virus attachment protein. *J Virol* 66:3860–3868
- Anderson EC, Williams SM, Fischer-Hoch SF, Wilkinson PJ (1987) Arachidonic acid metabolites in the pathophysiology of thrombocytopenia and haemorrhage in acute African swine fever. *Res Vet Sci* 42:387–394
- Anderson EC, Hutchings GH, Mukarati N, Wilkinson PJ (1998) African swine fever virus infection of the bushpig (*Potamochoerus porcus*) and its significance in the epidemiology of the disease. *Vet Microbiol* 62:1–15
- Andres G, Simon-Mateo C, Viñuela E (1997) Assembly of African swine fever virus: role of polyprotein pp220. *J Virol* 71:2331–2341
- Andres G, Garcia-Escudero R, Simon-Mateo C, Viñuela E (1998) African swine fever virus is enveloped by a two-membraned collapsed cisterna derived from the endoplasmic reticulum. *J Virol* 72:8988–9001
- Andres G, Garcia-Escudero R, Viñuela E, Salas ML, Rodriguez JM (2001) African

swine fever virus structural protein pE120R is essential for virus transport from assembly sites to plasma membrane but not for infectivity. *J Virol* 75:6758–6768

Andres G, Alejo A, Salas J, Salas ML (2002) African swine fever virus polyproteins pp220 and pp62 assemble into the core shell. *J Virol* 76:12473–12482.

Argilaguët J.M., Pérez-Martín E., Nofrarias M., Gallardo C., Accensi F., Lacasta A., Mora M., Ballester M., Galindo-Cardiel I., López-Soria S., Escribano J.M., Reche P.A., Rodríguez F. (2012). DNA vaccination partially protects against African swine fever virus lethal challenge in the absence of antibodies. *PLoS One*. 2012; 7(9):e40942. doi: 10.1371/journal.pone.0040942

Argilaguët J.M., Pérez-Martín E., López S., Goethe M., Escribano J.M., Giesow K., Keil G.M., Rodríguez F. (2013). BacMam immunization partially protects pigs against sublethal challenge with African swine fever virus. *Antiviral Res.* 2013 98(1):61-5. doi: 10.1016/j.antiviral.2013.02.005

Arias, M and Sanchez-Vizcaino, JM (2002) African swine fever. In *Trends in emerging viral infections of swine* (eds A Morilla, KJ Yoon and JJ Zimmerman), pp. 119–124. Ames, IA: Iowa State Press

Atuhaire DK, Afayoa M, Ochwo S, Mwesigwa S, Mwiine FN, Okuni JB, Olaho-Mukani W, Ojok L. (2013) Prevalence of African swine fever virus in apparently healthy domestic pigs in Uganda. *BMC Vet Res.* 9:263.

Atuhaire DK, Afayoa M, Ochwo S, Mwesigwa S, Okuni JB, Olaho-Mukani W, Ojok L. (2013) Molecular characterization and phylogenetic study of African swine fever virus isolates from recent outbreaks in Uganda (2010-2013). *Virol J.* 10:247.

Awosanya, E. J., Olugasa, B., Ogundipe, G. & Grohn, Y. T. (2015) Sero-prevalence and risk factors associated with African swine fever on pig farms in southwest Nigeria. *BMC Vet Res*, 11, 133.

Ballester, M., Rodríguez, F., 2015. In situ hybridization with labeled probes: assessment of African Swine Fever virus in formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *Methods Mol Biol* 1247, 209-218.

Banjara S., Caria S., Dixon L.K., Hinds M.G., Kvensakul M. (2017). Structural insight into African Swine Fever virus A179L mediated inhibition of apoptosis. *J Virol.* 2017 doi:10.1128/JVI.02228-16

Barongo, M. B., Stahl, K., Bett, B., Bishop, R. P., Fevre, E. M., Aliro, T., et al. (2015) Estimating the Basic Reproductive Number (R0) for African Swine Fever Virus (ASFV) Transmission between Pig Herds in Uganda. *PLoS One*, 10, e0125842.

Barrado Gil L., Galindo I., Martínez Alonso D., Viedma S., Alonso C. (2017). The ubiquitine proteasome system is required for African swine fever replication. *Plos One*. 2017 12(12):e0189741. doi: 10.1371/journal.pone.0189741.

Bastos AD, Penrith ML, Cruciere C, Edrich JL, Hutchings G, Roger F, Couacy-Hymann ER, Thomson G (2003) Genotyping field strains of African swine fever virus by partial p72 gene characterisation. *Arch Virol* 148:693–706

Baylis SA, Dixon LK, Vydellingum S, Smith GL (1992) African swine fever virus encodes a gene with extensive homology to type II DNA topoisomerases. *J Mol Biol* 228:1003–1010

Baylis SA, Twigg SR, Vydellingum S, Dixon LK, Smith GL (1993b) Three African

swine fever virus genes encoding proteins with homology to putative helicases of vaccinia virus. *J Gen Virol* 74:1969–1974

Bishop, R. P., Fleischauer, C., de Villiers, E. P., Okoth, E. A., Arias, M., Gallardo, C., et al. (2015) Comparative analysis of the complete genome sequences of Kenyan African swine fever virus isolates within p72 genotypes IX and X. *Virus Genes*, 50, 303-309.

Blasco R, Lopez-Otin C, Munoz M, Bockamp EO, Simon-Mateo C, Vinuela E (1990) Sequence and evolutionary relationships of African swine fever virus thymidine kinase. *Virology* 178:301–304

Blome S, Gabriel C, Dietze K, Breithaupt A, Beer M. (2012) High virulence of African swine fever virus caucasus isolate in European wild boars of all ages. *Emerg Infect Dis.* 18(4):708.

Blome S, Gabriel C, Beer M. (2013) Pathogenesis of African swine fever in domestic pigs and European wild boar. *Virus Res.* 173(1):122-30

Blomstrom, A. L., Stahl, K., Masembe, C., Okoth, E., Okurut, A. R., Atmnedi, P., et al. (2012) Viral metagenomic analysis of bushpigs (*Potamochoerus larvatus*) in Uganda identifies novel variants of Porcine parvovirus 4 and Torque teno sus virus 1 and 2. *Virol J*, 9, 192.

Boinas, FS, Hutchings, GH, Dixon, LK and Wilkinson, PJ (2004) Characterization of pathogenic and non-pathogenic African swine fever virus isolates from *Ornithodoros erraticus* inhabiting pig premises in Portugal. *J Gen Virol* 85:2177–2187

Boklund, A, Toft, N, Alban, L, and Uttenthal, A (2009). Comparing the epidemiological and economic effects of control strategies against classical swine fever in Denmark. *Prev Vet Med* 90:180-93

Borca MV, Irusta P, Carrillo C, Afonso CL, Burrage TG, Rock DL (1994a) African swine fever virus structural protein p72 contains a conformational neutralizing epitope. *Virology* 201:413–418

Borca MV, Kutish GK, Afonso CL, Irusta P, Carrillo C, Brun A, Sussman M, Rock DL (1994b) An African swine fever virus gene with similarity to the T-lymphocyte surface antigen CD2 mediates hemadsorption. *Virology* 199:463–468

Borca MV, Carrillo C, Zsak L, Laegreid WW, Kutish GF, Neilan JG, Burrage TG, Rock DL (1998). Deletion of a CD2-like gene, 8-DR, from African swine fever virus affects viral infection in domestic swine. *J Virol* 72:2881–2889.

Borca, MV, O'Donnell V, Holinka LG, Rai DK, Sanford B, Alfano M, Carlson J, Azzinaro PA, Alonso C, Gladue DP. (2016). The Ep152R ORF of African swine fever virus strain Georgia encodes for an essential gene that interacts with host protein BAG6. *Virus Research* (2016) 223:181-189

Bosch, J., Iglesias, I., Munoz, M. J. & de la Torre, A. (2016) A Cartographic Tool for Managing African Swine Fever in Eurasia: Mapping Wild Boar Distribution Based on the Quality of Available Habitats. *Transbound Emerg Dis.*

Bosch, J., Rodriguez, A., Iglesias, I., Munoz, M. J., Jurado, C., Sanchez-Vizcaino, J. M., et al. (2016) Update on the Risk of Introduction of African Swine Fever by Wild Boar into Disease-Free European Union Countries. *Transbound Emerg Dis.*

Boshoff, C. I., Bastos, A. D., Dube, M. M. & Heath, L. (2014) First molecular

assessment of the African swine fever virus status of *Ornithodoros* ticks from Swaziland. *Onderstepoort J Vet Res*, 81, E1-5.

Bournsnell M, Shaw K, Yanez RJ, Viñuela E, Dixon L (1991) The sequences of the ribonucleotide reductase genes from African swine fever virus show considerable homology with those of the orthopoxvirus, vaccinia virus. *Virology* 184:411–416

Braae UC, Johansen MV, Ngowi HA, Rasmussen TB, Nielsen J, Uttenthal Å. (2015) Detection of African swine fever virus DNA in blood samples stored on FTA cards from asymptomatic pigs in Mbeya region, Tanzania. *Transbound Emerg Dis*. 62(1):87-90.

Breese SSJ, DeBoer JC (1966) Electron microscope observations of African swine fever virus in tissue culture cells. *Virology* 28:420–428

Brookes SM, Sun H, Dixon LK, Parkhouse RM (1998b) Characterization of African swine fever virion proteins j5R and j13L: immuno-localization in virus particles and assembly sites. *J Gen Virol* 79:1179–1188

Camacho A, Viñuela E (1991) Protein p22 of African swine fever virus: an early structural protein that is incorporated into the membrane of infected cells. *Virology* 181:251–257

Carpintero R, Alonso C, Pineiro M, Iturralde M, Andres M, Le Potier MF, Madec F, Alava MA, Pineiro A, Lampreave F (2007) Pig major acute-phase protein and apolipoprotein A-I responses correlate with the clinical course of experimentally induced African swine fever and Aujeszky's disease. *Vet Res* 38:741–753

Carrasco L, de Lara FC, Martin de las Mulas J, Gomez-Villamandos JC, Perez J, Wilkinson PJ, Sierra MA (1996) Apoptosis in lymph nodes in acute African swine fever. *J Comp Pathol* 115:415–428

Carrascosa JL, Carazo JM, Carrascosa AL, García N, Santisteban A, Viñuela E (1984) General morphology and capsid fine structure of African swine fever virus particles. *Virology* 132:160–172

Carrascosa JL, Del Val M, Santaren JF, Viñuela E (1985) Purification and properties of African swine fever virus. *J Virol* 54:337–344

Carrascosa JL, Gonzalez P, Carrascosa AL, Garcia-Barreno B, Enjuanes L, Viñuela E (1986) Localization of structural proteins in African swine fever virus particles by immunoelectron microscopy. *J Virol* 58:377–384

Carrascosa, A.L., Bustos, M.J., de Leon, P., 2011. Methods for growing and titrating African swine fever virus: field and laboratory samples. *Current protocols in cell biology* / editorial board, Juan S. Bonifacino ... [et al.] Chapter 26, Unit 26 14.

Carrillo C, Borea MV, Afonso CL, Onisk DV, Rock DL (1994) Long-term persistent infection of swine monocytes/macrophages with African swine fever virus. *J Virol* 68:580–583

Chenais, E., Boqvist, S., Sternberg-Lewerin, S., Emanuelson, U., Ouma, E., Dione, M., et al. (2017) Knowledge, Attitudes and Practices Related to African Swine Fever Within Smallholder Pig Production in Northern Uganda. *Transbound Emerg Dis*, 64, 101-115.

Chenais, E., Sternberg-Lewerin, S., Boqvist, S., Emanuelson, U., Aliro, T., Tejler, E., et al. (2015) African Swine Fever in Uganda: Qualitative Evaluation of Three Surveillance Methods with Implications for Other Resource-Poor Settings. *Front Vet Sci*, 2, 51.

Chenais, E., Sternberg-Lewerin, S., Boqvist, S., Liu, L., LeBlanc, N., Aliro, T., et al. (2017) African swine fever outbreak on a medium-sized farm in Uganda: biosecurity breaches and within-farm virus contamination. *Trop Anim Health Prod*, 49, 337-346.

Childerstone A, Takamatsu H, Yang H, Denyer M, Parkhouse RM (1998) Modulation of T cell and monocyte function in the spleen following infection of pigs with African swine fever virus. *Vet Immunol Immunopathol* 62:281–296

Coggins L (1974) African swine fever virus. Pathogenesis. *Prog Med Virol* 18:48–63

Colgrove GS, Haelterman EO, Coggins L (1969) Pathogenesis of African swine fever in young pigs. *Am J Vet Res* 30:1343–1359

Conceicao JM (1949) Estudo das zoonoses porcinas de ngola; primeiro relatorio. A zoonose porcina africana de virus filtravel. *Pecuaria* 1:217–245

Costard S, Wieland B, de Glanville W, Jori F, Rowlands R, Vosloo W, Roger F, Pfeiffer DU, Dixon LK (2009) African swine fever: how can global spread be prevented? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 364:2683-96

Costard S, Mur L, Lubroth J, Sanchez-Vizcaino JM, Pfeiffer DU. (2013) Epidemiology of African swine fever virus. *Virus Res*. 173(1):191-7.

Creig A, Plowright W (1970) The excretion of two virulent strains of African swine fever virus by domestic pigs. *J Hyg, Cambridge* 68:673–682

Cubillos C, Gómez-Sebastian S, Moreno N, Nuñez MC, Mulumba-Mfumum LK, Quembo CJ, Heath L, Etter EM, Jori F, Escribano JM, Blanco E. African swine fever virus serodiagnosis: A general review with a focus on the analyses of African serum samples. *Virus Res*. 173(1):159-67. 2013

Cuesta-Geijo M.A., M. Chiappi, I. Galindo, L. Barrado-Gil, R. Muñoz-Moreno, José L. Carrascosa and C. Alonso. (2016). Cholesterol flux is required for endosomal progression of African swine fever virus. *Journal of Virology* 90 (3), 1534-1543.

Cuesta-Geijo MA, Barrado Gil L, Galindo I, Munoz Moreno R, Alonso C. (2017). Redistribution of endosomal membranes to the African swine fever virus replication site. *Viruses* 2017 9(6). pii: E133. doi: 10.3390/v9060133

de Carvalho Ferreira HC, Weesendorp E, Elbers AR, Bouma A, Quak S, Stegeman JA, Loeffen WL. (2012) African swine fever virus excretion patterns in persistently infected animals: a quantitative approach. *Vet Microbiol*. 160 (3-4):327-40

de Carvalho Ferreira HC, Weesendorp E, Quak S, Stegeman JA, Loeffen WL. (2013) Quantification of airborne African swine fever virus after experimental infection. *Vet Microbiol*. 165(3-4):243-51.

de Carvalho Ferreira HC, Weesendorp E, Quak S, Stegeman JA, Loeffen WL. (2014) Suitability of faeces and tissue samples as a basis for non-invasive sampling for African swine fever in wild boar. *Vet Microbiol*. 172(3-4):449-54.

Dee SA, Bauermann FV, Niederwerder MC, Singrey A, Clement T, de Lima M, Long C, Patterson G, Sheahan MA, Stoian AMM, Petrovan V, Jones CK, De Jong J, Ji J, Spronk GD, Minion L, Christopher-Hennings J, Zimmerman JJ, Rowland RRR, Nelson E, Sundberg P, Diel DG. (2018) Survival of viral pathogens in animal feed ingredients under transboundary shipping models. *PLoS One*. 13(3):e0194509.

DeKock G, Robinson EM, Keppel JGG (1940) Swine fever in South Africa.

- Onderstepoort J Vet Sci Animal Industry 14:31–93
- de León, P., Bustos, M.J., Carrascosa, A.L., 2013. Laboratory methods to study African swine fever virus. *Virus Res* 173, 168-179.
- del Val M, Viñuela E. (1987). Glycosylated components induced in African swine fever (ASF) virus-infected Vero cells. *Virus Res* 7:297–308
- Denyer, MS, Wileman, TE, Stirling, CMA, Zuber, B and Takamatsu, HH (2006) Perforin expression can define CD8 positive lymphocyte subsets in pigs allowing phenotypic and functional analysis of natural killer, cytotoxic T, natural killer Tand MHC un-restricted cytotoxic T-cells. *Vet Immunol Immunopathol* 110:279–292
- Detray DE (1957) Persistence of viremia and immunity in African swine fever. *Am J Vet Res* 18:811–816
- Detray DE (1963) African swine fever. *Adv Vet Sci Comp Med* 8:299–333
- Detray DE, Scott GR (1957) Blood changes in swine with African swine fever. *Am J Vet Res* 18:484–490
- Dixon LK, Wilkinson PJ (1988) Genetic diversity of African swine fever virus isolates from soft ticks (*Ornithodoros moubata*) inhabiting warthog burrows in Zambia. *J Gen Virol* 69:2981–2993
- Dixon LK, Costa JV, Escribano JM, Rock DL, Viñuela E, Wilkinson PJ (2000) Family Asfarviridae. *Virus taxonomy: seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. In: van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Carstens EB, Estes MK, Lemon SM, Maniloff J, Mayo MA, McGeohh DL, Pringle CR, Wickner RB (eds), Academic, San Diego, pp 159–165
- Dixon, LK, Escribano, JM, Martins, C, Rock, DL, Salas, ML, and Wilkinson, PJ (2005) Asfarviridae. In *Virus taxonomy. VIIIth Report of the ICTV* (eds CM Fauquet, MA Mayo, J Maniloff, U Desselberger and LA Ball), pp. 135–143. London, UK: Elsevier/Academic Press.
- Dixon, LK, Abrams, CC, Chapman, DG, and Zhang, F. (2008) African swine fever virus. In *Animal viruses molecular biology* (eds TC Mettenleiter & F Sobrino), pp. 457–521. Norwich, UK: Caister Academic Press.
- Edwards JF (1983) The pathogenesis of thrombocytopenia and haemorrhage in African swine fever. PhD Thesis, Cornell University. Ithaca, New York
- Edwards JF, Dodds WJ, Slauson DO (1985) Mechanism of thrombocytopenia in African swine fever. *Am J Vet Res* 46:2058–2063
- Erickson A, Fisher M, Furukawa-Stoffer T, Ambagala A, Hodko D, Pasick J, King DP, Nfon C, Ortega Polo R, Lung O. (2018) A multiplex reverse transcription PCR and automated electronic microarray assay for detection and differentiation of seven viruses affecting swine. *Transbound Emerg Dis*. 65(2):e272-e283.
- Estevez A, Marquez MI, Costa JV (1986) Two-dimensional analysis of African swine fever virus proteins and proteins induced in infected cells. *Virology* 152:192–206
- Esteves A, Ribeiro G, Costa JV (1987) DNA-binding proteins specified by African swine fever virus. *Virology* 161:403–409
- Fernandez-Pinero, J., Gallardo, C., Elizalde, M., Robles, A., Gomez, C., Bishop, R., Heath, L., Couacy-Hymann, E., Fasina, F.O., Pelayo, V., Soler, A., Arias, M., 2013. Molecular diagnosis of African Swine Fever by a new real-time PCR using universal

probe library. *Transbound Emerg Dis* 60, 48-58.

Forman AJ, Wardley RC, Wilkinson PJ (1982) The immunological response of pigs and guinea pigs to antigens of African swine fever virus. *Arch Virol* 74:91–100

Frączyk M, Woźniakowski G, Kowalczyk A, Niemczuk K, Pejsak Z. (2016) Development of cross-priming amplification for direct detection of the African Swine Fever Virus, in pig and wild boar blood and sera samples. *Lett Appl Microbiol.* 62(5):386-91.

Freije JM, Lain S, Viñuela E, Lopez-Otin C (1993) Nucleotide sequence of a nucleoside triphosphate phosphohydrolase gene from African swine fever virus. *Virus Res* 30:63–72

Freitas FB, Frouco G, Martins C, Leitao A, Ferreira F. (2016). In vitro inhibition of African swine fever virus-topoisomerase II disrupts viral replication. *Antiviral Res.* 2016 134:34-41

Freitas FB, Frouco G, Martins C, Ferreira F. (2018). African swine fever virus encodes for an E2-ubiquitin conjugating enzyme that is mono- and diubiquitinated and required for viral replication cycle. *Scientific Reports* 2018 (2018) 8:3471 DOI:10.1038/s41598-018-21872-2

Frouco G, Freitas FB, Coelho J, Leitao A, Martins C, Ferreira F. DNA-Binding Properties of African Swine Fever Virus pA104R, a Histone-Like Protein Involved in Viral Replication and Transcription. *J Virol.* vol. 91 no. 12e02498-16

Gabriel C, Blome S, Malogolovkin A, Parilov S, Kolbasov D, Teifke JP, Beer M. (2011) Characterization of African swine fever virus Caucasus isolate in European wild boars. *Emerg Infect Dis.* 17(12):2342-5.

Gallardo, C., Mwaengo, D. M., Macharia, J. M., Arias, M., Taracha, E. A., Soler, A., et al. (2009) Enhanced discrimination of African swine fever virus isolates through nucleotide sequencing of the p54, p72, and pB602L (CVR) genes. *Virus Genes*, 38, 85-95.

Gallardo, C., Okoth, E., Pelayo, V., Anchuelo, R., Martin, E., Simon, A., et al. (2011) African swine fever viruses with two different genotypes, both of which occur in domestic pigs, are associated with ticks and adult warthogs, respectively, at a single geographical site. *J Gen Virol*, 92, 432-444.

Gallardo, C., Nieto, R., Soler, A., Pelayo, V., Fernandez-Pinero, J., Markowska-Daniel, I., Pridotkas, G., Nurmoja, I., Granta, R., Simon, A., Perez, C., Martin, E., Fernandez-Pacheco, P., Arias, M., 2015. 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. *Journal of clinical microbiology* 53, 2555-2565.

Gallardo C., Reoyo-de la Torre, A., Fernández-Pinero, J., Iglesias, I., Muñoz, J., Arias, ML. (2015) African swine fever: a global view of the current challenge. *Porcine Health Management* 1:21 DOI 10.1186/s40813-015-0013-y

Gallardo C, Sánchez EG, Pérez-Núñez D, Nogal M, de León P, Carrascosa ÁL, Nieto R, Soler A, Arias ML, Revilla Y. (2018). African swine fever virus (ASFV) protection mediated by NH/P68 and NH/P68 recombinant live-attenuated viruses. *Vaccine.* 2018 36(19):2694-2704.

- Garcia-Escudero R, Andres G, Almazan F, Vinuela E (1998) Inducible gene expression from African swine fever virus recombinants: analysis of the major capsid protein. *J Virol* 72:3185–3195
- Gil S, Spagnuolo-Weaver M, Canals A, Sepúlveda N, Oliveira J, Aleixo A, Allan G, Leitão A, Martins CL (2003) Expression at mRNA level of cytokines and A238L gene in porcine blood-derived macrophages infected in vitro with African swine fever virus (ASFV) isolates of different virulence. *Arch Virol* 148:2077–2097
- Gomez-Puertas P, Rodriguez F, Oviedo JM, Ramiro-Ibañez F, Ruiz-Gonzalvo F, Alonso C, Escribano JM (1996) Neutralizing antibodies to different proteins of African swine fever virus inhibit both virus attachment and internalization. *J Virol* 70:5689–5694
- Gomez-Puertas P, Rodriguez F, Oviedo JM, Brun A, Alonso C, Escribano JM (1998) The African swine fever virus proteins p54 and p30 are involved in two distinct steps of virus attachment and both contribute to the antibody-mediated protective immune response. *Virology* 243:461–471
- Gomez-Villamandos JC, Hervas J, Mendez A, Carrasco L, de las Mulas JM, Villeda CJ, Wilkinson PJ, Sierra MA (1995) Experimental African swine fever: apoptosis of lymphocytes and virus replication in other cells *J Gen Virol* 76:2399–2405
- Gomez del Moral M, Ortuno E, Fernandez-Zapatero P, Alonso F, Alonso C, Ezquerro A, Dominguez J (1999) African swine fever virus infection induces tumor necrosis factor alpha production: implications in pathogenesis. *J Virol* 73:2173–2180
- Granja AG, Nogal ML, Hurtado C, Vila V, Carrascosa AL, Salas ML, Fresno M, Revilla Y (2004b) The viral protein A238L inhibits cyclooxygenase-2 expression through a nuclear factor of activated T cell-dependent transactivation pathway. *J Biol Chem* 279:53736–53746
- Grau FR, Schroeder ME, Mulhern EL, McIntosh MT, Bounpheng MA. (2015) Detection of African swine fever, classical swine fever, and foot-and-mouth disease viruses in swine oral fluids by multiplex reverse transcription real-time polymerase chain reaction. *J Vet Diagn Invest.* 27(2):140-9. doi: 10.1177/1040638715574768.
- Guinat, C., Gogin, A., Blome, S., Keil, G., Pollin, R., Pfeiffer, D. U., et al. (2016) Transmission routes of African swine fever virus to domestic pigs: current knowledge and future research directions. *Vet Rec*, 178, 262-267.
- Hamdy FM, Dardiri AH (1984) Clinic and immunologic responses of pigs to African swine virus isolated from the Western hemisphere. *Am J Vet Res* 45:711–714
- Haresnape JM, Wilkinson PJ, Mellor PS (1988) Isolation of African swine fever virus from ticks of the *Ornithodoros moubata* complex (Ixodoidea: Argasidae) collected within the African swine fever enzootic area of Malawi. *Epidemiol Inf* 101:173–185
- Heuschele WP, Coggins L (1969) Epizootiology of African swine fever in warthogs. *Bull Epizoot Dis Afr* 17:179–183
- Hingamp PM, Arnold JE, Mayer RJ, Dixon LK (1992) A ubiquitin conjugating enzyme encoded by African swine fever virus *EMBO J* 11:361–366
- Hu L, Lin XY, Yang ZX, Yao XP, Li GL, Peng SZ, Wang Y. (2015) A multiplex PCR for simultaneous detection of classical swine fever virus, African swine fever virus, highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus, porcine reproductive and respiratory syndrome virus and pseudorabies in swines. *Pol J Vet Sci.*

18(4):715-23.

Iglesias, I., Munoz, M. J., Montes, F., Perez, A., Gogin, A., Kolbasov, D., et al. (2016) Reproductive Ratio for the Local Spread of African Swine Fever in Wild Boars in the Russian Federation. *Transbound Emerg Dis*, 63, e237-e245.

Iglesias, I., Rodriguez, A., Feliziani, F., Rolesu, S. & de la Torre, A. (2017) Spatio-temporal Analysis of African Swine Fever in Sardinia (2012-2014): Trends in Domestic Pigs and Wild Boar. *Transbound Emerg Dis*, 64, 656-662.

Irusta PM, Borca MV, Kutish GF, Lu Z, Caler E, Carrillo C, Rock DL (1996) Amino acid tandem repeats within a late viral gene define the central variable region of African swine fever virus. *Virology* 220:20–27

pigs infected with African Swine Fever Virus. 3rd Annual GARA scientific workshop. Ploufragan, France. September 6, 2016.

Jancovich JK, Chapman D, Hansen DT, Robida MD, Loskutov A, Craciunescu F, Borovkov A, Kibler K, Goatley L, King K, Netherton CL, Taylor G, Jacobs B, Sykes K, Dixon LK. (2018). Immunization of Pigs by DNA Prime and Recombinant Vaccinia Virus Boost To Identify and Rank African Swine Fever Virus Immunogenic and Protective Proteins. *J Virol*. 2018 92(8). pii: e02219-17. doi: 10.1128/JVI.02219-17.

Jori, F. & Bastos, A. D. (2009) Role of wild suids in the epidemiology of African swine fever. *Ecohealth*, 6, 296-310.

Jori, F., Vial, L., Penrith, M. L., Perez-Sanchez, R., Etter, E., Albina, E., et al. (2013) Review of the sylvatic cycle of African swine fever in sub-Saharan Africa and the Indian ocean. *Virus Res*, 173, 212-227.

Kabuuka, T., Kasaija, P. D., Mulindwa, H., Shittu, A., Bastos, A. D. & Fasina, F. O. (2014) Drivers and risk factors for circulating African swine fever virus in Uganda, 2012-2013. *Res Vet Sci*, 97, 218-225.

Kalenzi Atuhaire D, Ochwo S, Afayoa M, Norbert Mwiine F, Kokas I, Arinaitwe E, Ademun-Okurut RA, Boniface Okuni J, Nanteza A, Ayebazibwe C, Okedi L, Olaho-Mukani W, Ojok L. (2013) Epidemiological Overview of African Swine Fever in Uganda (2001-2012). *J Vet Med*. 2013:949638.

Keil GM; Goller K; Pollin R; Bishop R; Höper D; Blome S; Portugal R. (2016). Adaptation of African Swine Fever Virus field strains to productively replicate in WSL cells is not necessarily associated with larger deletions within the viral genomes. 3rd Annual GARA scientific workshop. Ploufragan, France. September 6, 2016.

Kihm U, Ackerman M, Mueller H, Pool R (1987) Approaches to vaccination. In: African swine fever. Becker Y (ed) Martinus Nijhoff, Boston, pp 127–144

King, D.P., Reid, S.M., Hutchings, G.H., Grierson, S.S., Wilkinson, P.J., Dixon, L.K., Bastos, A.D., Drew, T.W., 2003. Development of a TaqMan PCR assay with internal amplification control for the detection of African swine fever virus. *J Virol Methods* 107, 53-61.

Konno S, Taylor WD, Dardiri AH (1971a) Acute African swine fever. Proliferative phase in lymphoreticular tissue and the reticuloendothelial system. *Cornell Vet* 61:71–84

Konno S, Taylor WD, Hess WR, Heuschele WP (1971b) Liver pathology in African swine fever. *Cornell Vet* 61:125–150

Konno S, Taylor WD, Hess WR, Heuschele WP (1972) Spleen pathology in African swine fever. *Cornell Vet* 62:486–506

Kukielka, E. A., Jori, F., Martinez-Lopez, B., Chenais, E., Masembe, C., Chavernac, D., et al. (2016) Wild and Domestic Pig Interactions at the Wildlife-Livestock Interface of Murchison Falls National Park, Uganda, and the Potential Association with African Swine Fever Outbreaks. *Front Vet Sci*, 3, 31.

Kuznar J, Salas ML, Viñuela E (1980) DNA-dependent RNA polymerase in African swine fever virus. *Virology* 101:169–175

Kuznar J, Salas ML, Viñuela E (1981) Nucleoside triphosphate phosphohydrolase activities in African swine fever virus. *Arch Virol* 69:307–310

Kyyro, J., Sahlstrom, L. & Lyytikainen, T. (2017) Assessment of the risk of African swine fever introduction into Finland using NORA-a rapid tool for semiquantitative assessment of the risk. *Transbound Emerg Dis*

Lacasta A, Ballester M, Monteagudo PL, Rodríguez JM, Salas ML, Accensi F, Pina-Pedrero S, Bensaid A, Argilaguet J, López-Soria S, Hutet E, Le Potier MF, Rodríguez F. (2014). Expression library immunization can confer protection against lethal challenge with African swine fever virus. *J Virol*. 2014 88(22):13322-32. doi: 10.1128/JVI.01893-14.

Leitao, A, Cartaxeiro, C, Coelho, R, Cruz, B, Parkhouse, RME, Portugal, FC, Vigario, JD and Martins, CLV (2001) The non-haemadsorbing African swine fever virus isolate ASFV/NH/P68 provides a model for defining the protective anti-virus immune response. *J Gen Virol* 82:513–523

Lewis T, Zsak L, Burrage TG, Lu Z, Kutish GF, Neilan JG, Rock DL (2000) An African swine fever virus ERV1-ALR homologue, 9GL, affects virion maturation and viral growth in macrophages and viral virulence in swine. *J Virol* 74:1275–1285

Lichoti, J. K., Davies, J., Kitala, P. M., Githigia, S. M., Okoth, E., Maru, Y., et al. (2016) Social network analysis provides insights into African swine fever epidemiology. *Prev Vet Med*, 126, 1-10.

Lichoti, J. K., Davies, J., Maru, Y., Kitala, P. M., Githigia, S. M., Okoth, E., et al. (2017) Pig traders' networks on the Kenya-Uganda border highlight potential for mitigation of African swine fever virus transmission and improved ASF disease risk management. *Prev Vet Med*, 140, 87-96.

Liu L, Luo Y, Accensi F, Ganges L, Rodríguez F, Shan H, Ståhl K, Qiu HJ, Belák S. (2017). Pre-Clinical Evaluation of a Real-Time PCR Assay on a Portable Instrument as a Possible Field Diagnostic Tool: Experiences from the Testing of Clinical Samples for African and Classical Swine Fever Viruses. Liu L, Luo Y, Accensi F, Ganges L, Rodríguez F, Shan H, Ståhl K, Qiu HJ, Belák S. *Transbound Emerg Dis*.;64(5)

Lokhandwala S, Waghela SD, Bray J, Sangewar N, Charendoff C, Martin CL, Hassan WS, Koynarski T, Gabbert L, Burrage TG, Brake D, Neilan J, Mwangi W. (2017). Adenovirus vectored novel ASFV antigens elicit robust immune responses in swine. *PLoS One*. 2017 12(5):e0177007. doi: 10.1371/journal.pone.0177007.

Lopera-Madrid J, Osorio JE, He Y, Xiang Z, Adams LG, Laughlin RC, Mwangi W, Subramanya S, Neilan J, Brake D, Burrage TG, Brown WC, Clavijo A, Bounpheng MA. (2017). Safety and immunogenicity of mammalian cell derived and Modified Vaccinia

- Ankara vectored African swine fever subunit antigens in swine. *Vet Immunol Immunopathol.* 2017 185:20-33. doi: 10.1016/j.vetimm.2017.01.004.
- Lopez-Otin C, Simon C, Mendez E, Viñuela E (1988) Mapping and sequence of the gene encoding protein p37, a major structural protein of African swine fever virus. *Virus Genes* 1:291–303
- Lopez-Otin C, Freije JM, Parra F, Mendez E, Viñuela E (1990) Mapping and sequence of the gene coding for protein p72, the major capsid protein of African swine fever virus. *Virology* 175:477–484
- Lubisi BA, Bastos ADS, Dwarka RM, Vosloo W (2003) Genotyping African swine fever virus strains from East Africa. *Proceedings of the Conference of Southern African Society of Veterinary Epidemiology Preventive Medicine. Roodevallei*, pp 10–14
- Luka, P. D., Achenbach, J. E., Mwiine, F. N., Lamien, C. E., Shamaki, D., Unger, H., et al. (2016) Genetic Characterization of Circulating African Swine Fever Viruses in Nigeria (2007-2015). *Transbound Emerg Dis.*
- Lung O, Fisher M, Erickson A, Nfon C, Ambagala A. (2018) Fully automated and integrated multiplex detection of high consequence livestock viral genomes on a microfluidic platform. *Transbound Emerg Dis.* 10.1111/tbed.12994
- Luo, Y., Atim, S. A., Shao, L., Ayebazibwe, C., Sun, Y., Liu, Y., et al. (2017) Development of an updated PCR assay for detection of African swine fever virus. *Arch Virol*, 162, 191-199.
- Lyra, TM P (2006) The eradication of African swine fever in Brazil, 1978–1984. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epizoot.* 25:93–103.
- Manso Ribeiro J, Rosa Azevedo F (1961) Réapparition de la peste porcine africaine (PPA) au Portugal. *Bull Off Int Epizoot* 55:88–106
- Martin Hernandez AM, Tabares E (1991) Expression and characterization of the thymidine kinase gene of African swine fever virus. *J Virol* 65:1046–1052
- Martins A, Ribeiro G, Marques MI, Costa JV (1994) Genetic identification and nucleotide sequence of the DNA polymerase gene of African swine fever virus. *Nucleic Acids Res* 22:208–213
- Maurer FD, Griesemer RA, Jones FC (1958) The pathology of African swine fever – a comparison with hog cholera. *Am J Vet Res* 19:517–539
- McVicar JW. (1984) Quantitative aspects of the transmission of African swine fever. *Am J Vet Res.* 45(8):1535-41.
- Mebus CA (1988) African swine fever. *Adv Virus Res* 35:251–269
- Mebus CA, Dardiri AH.(1980) Western hemisphere isolates of African swine fever virus: asymptomatic carriers and resistance to challenge inoculation. *Am J Vet Res.* 41(11):1867-9.
- Mendes AM (1961) Considérations sur le diagnostic et la prophylaxie de la peste porcine africaine. *Bull Off Int Epizoot* 57:591–600
- Misinzo G, Kwavi DE, Sikombe CD, Makange M, Peter E, Muhairwa AP, Madege MJ. (2014) Molecular characterization of African swine fever virus from domestic pigs in northern Tanzania during an outbreak in 2013. *Trop Anim Health Prod.* 46(7):1199-207.
- Miskin JE, Abrams CC, Goatley LC, Dixon LK (1998) A viral mechanism for inhibition of the cellular phosphatase calcineurin. *Science* 281:562–565

- Monteagudo PL, Lacasta A, López E, Bosch L, Collado J, Pina-Pedrero S, Correa-Fiz F, Accensi F, Navas MJ, Vidal E, Bustos MJ, Rodríguez JM, Gallei A, Nikolin V, Salas ML, Rodríguez F. (2017). BA71ΔCD2: a New Recombinant Live Attenuated African Swine Fever Virus with Cross-Protective Capabilities. *J Virol.* 2017 91(21). pii: e01058-17
- Montgomery RE (1921) A form of swine fever occurring in British East Africa (Kenya Colony). *J Comp Pathol* 34:159–191
- Moore DM, Zsak L, Neilan JG, Lu Z, Rock DL (1998) The African swine fever virus thymidine kinase gene is required for efficient replication in swine macrophages and for virulence in swine. *J Virol* 72:10310–10315
- Moulton J, Coggins L (1968a) Comparison of lesions in acute and chronic African swine fever. *Cornell Vet* 58:364–388
- Moulton J, Coggins L (1968b) Synthesis and cytopathogenesis of African swine fever virus in porcine cell cultures. *Am J Vet Res* 29:219–232
- Moura Nunes JF, Vigario JD, Terrinha AM (1975) Ultrastructural study of African swine fever virus replication in cultures of swine bone marrow cells. *Arch Virol* 49:59–66
- Muhangi D, Masembe C, Emanuelson U, Boqvist S, Mayega L, Ademun RO, Bishop RP, Ocaido M, Berg M, Ståhl K. (2015) A longitudinal survey of African swine fever in Uganda reveals high apparent disease incidence rates in domestic pigs, but absence of detectable persistent virus infections in blood and serum. *BMC Vet Res.* 11:106.
- Mujibi FD, Okoth E, Cheruiyot EK, Onzere C, Bishop RP, Fèvre EM, Thomas L, Masembe C, Plastow G, Rothschild M. (2018) Genetic diversity, breed composition and admixture of Kenyan domestic pigs. *PLoS One.*13(1):e0190080.
- Muñoz-Moreno R., M.A., Freije JM, Salas ML, Viñuela E, Lopez-Otin C (1993) Structure and expression in *E. coli* of the gene coding for protein p10 of African swine fever virus. *Arch Virol* 130:93–107
- Muñoz-Moreno R., M.A. Cuesta-Geijo, L. Barrado-Gil, C. Martínez-Romero, I. Galindo, A. García-Sastre and C. Alonso. (2016). Antiviral role of Interferon-induced transmembrane (IFITM) proteins in African Swine Fever Virus infection. *PLoS ONE* 11(4): e0154366.
- Mur, L., Iscaro, C., Cocco, M., Jurado, C., Rolesu, S., De Mia, G. M., et al. (2017) Serological Surveillance and Direct Field Searching Reaffirm the Absence of *Ornithodoros erraticus* Ticks Role in African Swine Fever Cycle in Sardinia. *Transbound Emerg Dis*, 64, 1322-1328.
- Mur, L., Sanchez-Vizcaino, J. M., Fernandez-Carrion, E., Jurado, C., Rolesu, S., Feliziani, F., et al. (2017) Understanding African Swine Fever infection dynamics in Sardinia using a spatially explicit transmission model in domestic pig farms. *Transbound Emerg Dis*.
- Muwonge, A., Munang'andu, H. M., Kankya, C., Biffa, D., Oura, C., Skjerve, E., et al. (2012) African swine fever among slaughter pigs in Mubende district, Uganda. *Trop Anim Health Prod*, 44, 1593-1598.
- Nantima, N., Davies, J., Dione, M., Ocaido, M., Okoth, E., Mugisha, A., et al. (2016) Enhancing knowledge and awareness of biosecurity practices for control of African

swine fever among smallholder pig farmers in four districts along the Kenya-Uganda border. *Trop Anim Health Prod*, 48, 727-734.

Nantima, N., Ocaido, M., Ouma, E., Davies, J., Dione, M., Okoth, E., et al. (2015) Risk factors associated with occurrence of African swine fever outbreaks in smallholder pig farms in four districts along the Uganda-Kenya border. *Trop Anim Health Prod*, 47, 589-595.

Neilan JG, Lu Z, Afonso CL, Kutish GF, Sussman MD, Rock DL (1993a) An African swine fever virus gene with similarity to the proto-oncogene *bcl-2* and the Epstein-Barr virus gene *BHRF1*. *J Virol* 67:4391–4394

Neilan JG, Lu Z, Kutish GF, Zsak L, Lewis TL, Rock DL (1997b) A conserved African swine fever virus IKB homolog, 5EL, is nonessential for growth in vitro and virulence in domestic pigs. *Virology* 235:377–385

Neilan JG, Borca MV, Lu Z, Kutish GF, Kleiboeker SB, Carrillo C, Zsak L, Rock DL (1999) An African swine fever virus ORF with similarity to C-type lectins is non-essential for growth in swine macrophages in vitro and for virus virulence in domestic swine. *J Gen Virol* 80:2693–2697

Neilan JG, Zsak L, Lu Z, Kutish GF, Afonso CL, Rock DL (2002) Novel swine virulence determinant in the left variable region of the African swine fever virus genome. *J Virol* 76:3095–3104

Neilan JG, Zsak L, Lu Z, Burrage TG, Kutish GF, Rock DL (2004) Neutralizing antibodies to African swine fever virus proteins p30, p54, and p72 are not sufficient for antibody-mediated protection. *Virology* 319:337–342

Netherton CL. Viral vectored African swine fever vaccines. GARA Scientific Conference, Sardinia, 2018.

Nieto-Pelegrín E, Rivera-Arroyo B, Sánchez-Vizcaíno JM. (2015) First Detection of Antibodies Against African Swine Fever Virus in Faeces Samples. *Transbound Emerg Dis*. 62(6):594-602.

Notomi, T, Okayama, H, Masubuchi, H, Yonekawa, T, Watanabe, K, Amino, N, Hase, T (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucl Acids Res* 28: E63.

Nunes Petisca JL (1965) Etudes anatomo-pathologiques et histopathologiques sur la peste porcine africaine (Virose L) au Portugal. *Bull Off Int Epizoot* 63:103–142

Nurmoja, I., Petrov, A., Breidenstein, C., Zani, L., Forth, J. H., Beer, M., et al. (2017) Biological characterization of African swine fever virus genotype II strains from north-eastern Estonia in European wild boar. *Transbound Emerg Dis*.

O'Donnell V, Holinka LG, Krug PW, Gladue DP, Carlson J, Sanford B, Alfano M, Kramer E, Lu Z, Arzt J, Reese B, Carrillo C, Risatti GR, Borca MV. (2015a). 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*. (16):8556-66. doi: 10.1128/JVI.00969-15.

O'Donnell V, Holinka LG, Gladue DP, Sanford B, Krug PW, Lu X, Arzt J, Reese B, Carrillo C, Risatti GR, Borca MV. (2015b). African Swine Fever Virus Georgia Isolate Harboring Deletions of MGF360 and MGF505 Genes Is Attenuated in Swine and Confers Protection against Challenge with Virulent Parental Virus. *J Virol*.

89(11):6048-56. doi: 10.1128/JVI.00554-15

O'Donnell V, Holinka LG, Sanford B, Krug PW, Carlson J, Pacheco JM, Reese B, Risatti GR, Gladue DP, Borca MV. (2016a). African swine fever virus Georgia isolate harboring deletions of 9GL and MGF360/505 genes is highly attenuated in swine but does not confer protection against parental virus challenge. *Virus Res.* Aug 2;221:8-14. doi: 10.1016/j.virusres.2016.05.014.

O'Donnell V, Risatti GR, Holinka LG, Krug PW, Carlson J, Velazquez-Salinas L, Azzinaro PA, Gladue DP, Borca MV. (2016b). Simultaneous Deletion of the 9GL and UK Genes from the African Swine Fever Virus Georgia 2007 Isolate Offers Increased Safety and Protection against Homologous Challenge. *J Virol.* 91(1). pii: e01760-16

Okoth E, Gallardo C, Macharia JM, Omoro A, Pelayo V, Bulimo DW, Arias M, Kitala P, Baboon K, Lekolol I, Mijele D, Bishop RP. (2013) Comparison of African swine fever virus prevalence and risk in two contrasting pig-farming systems in South-west and Central Kenya. *Prev Vet Med.* 110(2):198-205.

Olsevskis, E., Guberti, V., Serzants, M., Westergaard, J., Gallardo, C., Rodze, I., et al. (2016) African swine fever virus introduction into the EU in 2014: Experience of Latvia. *Res Vet Sci,* 105, 28-30.

Onisk DV, Borca MV, Kutish GF, Kramer E, Irusta P, Rock DL (1994) Passively transferred African swine fever virus antibodies protect swine against lethal infection. *Virology* 198:350–354

Oura CA, Powell PP, Anderson E, Parkhouse RMJ (1998a) The pathogenesis of African swine fever in the resistant bushpig. *Gen Virol* 79:1439–1443

Oura CA, Powell PP, Parkhouse RME (1998b) Detection of African swine fever virus in infected pig tissues by immunocytochemistry and in situ hybridisation. *J Virol Methods* 72:205–217

Oura CAL, Powell PP, Parkhouse RME (1998c) African swine fever: a disease characterized by apoptosis. *J Gen Virol* 79:1427–1438

Oura CAL, Denyer MS, Takamatsu H, Parkhouse RME (2005). In vivo depletion of CD8+ T lymphocytes abrogates protective immunity to African swine fever virus. *J Gen Virol* 86:2445–2450.

Penrith ML, Vosloo W, Jori F, Bastos AD. (2013). African swine fever virus eradication in Africa. *Virus Res.*;173: 228–46.

Perez-Filgueira M., F. Gonzalez, C. Gallardo, P. Resino., Esther Blanco and J.M. Escribano. Optimization and validation of recombinant serological tests for African swine fever diagnosis based on the p30 protein produced in *Trichoplusia ni* larvae. *J. Clin. Microbiol.* 44, 3114-3121. 2006

Petrov, A., Schotte, U., Pietschmann, J., Drager, C., Beer, M., Anheyer-Behmenburg, H., Goller, K.V., Blome, S., 2014. Alternative sampling strategies for passive classical and African swine fever surveillance in wild boar. *Veterinary microbiology.*

Petrov A, Forth JH, Zani L, Beer M, Blome S. (2018). No evidence for long-term carrier status of pigs after African swine fever virus infection. *Transbound Emerg Dis.* doi: 10.1111/tbed.12881

Pietschmann, J., Guinat, C., Beer, M., Pronin, V., Tauscher, K., Petrov, A., et al. (2015) Course and transmission characteristics of oral low-dose infection of domestic pigs and

European wild boar with a Caucasian African swine fever virus isolate. *Arch Virol*, 160, 1657-1667.

Pietschmann, J., Mur, L., Blome, S., Beer, M., Perez-Sanchez, R., Oleaga, A., et al. (2016) African swine fever virus transmission cycles in Central Europe: Evaluation of wild boar-soft tick contacts through detection of antibodies against *Ornithodoros erraticus* saliva antigen. *BMC Vet Res*, 12, 1.

Plowright W (1981) African swine fever. In: *Infectious Diseases of wild animals*, 2nd edn. Davis JW, Karstad LH, Trainer DO (eds) Iowa University Press, Ames, IA

Plowright W, Parker J, Peirce MA (1969a) African swine fever virus in ticks (*Ornithodoros moubata*, Murray) collected from animal burrows in Tanzania. *Nature* 221:1071–1073

Plowright W, Parker J, Pierce MA (1969b) The epizootiology of African swine fever in Africa. *Vet Rec* 85:668–674

Plowright W, Thomson GR, Naser JA (1994) African swine fever. *Infectious diseases of livestock*. In: Coetzer JAW, Thomson GR, Tustin RC (eds) Oxford University Press, Capetown pp. 568–599

Popescu L, Gaudreault NN, Whitworth KM, Murgia MV, Nietfeld JC, Mileham A, Samuel M, Wells KD, Prather RS, Rowland RRR. (2017). Genetically edited pigs lacking CD163 show no resistance following infection with African swine fever virus isolate Georgia 2007/1. *Virology* 501:102-106

Post J, Weesendorp E, Montoya M, Loeffen WL. (2017) Influence of Age and Dose of African Swine Fever Virus Infections on Clinical Outcome and Blood Parameters in Pigs. *Viral Immunol.* 30(1):58-69.

Powell PP, Dixon LK, Parkhouse RME (1996) An IKB homolog encoded by African swine fever virus provides a novel mechanism for downregulation of proinflammatory cytokine responses in host macrophages. *J Virol* 70:8527–8533

Quembo, C. J., Jori, F., Heath, L., Perez-Sanchez, R. & Vosloo, W. (2016) Investigation into the Epidemiology of African Swine Fever Virus at the Wildlife - Domestic Interface of the Gorongosa National Park, Central Mozambique. *Transbound Emerg Dis*, 63, 443-451.

Quintas A, Pérez-Núñez D, Sánchez EG, Nogal ML, Hentze MW, Castello A, Revilla Y. Characterization of the African swine fever virus decapping enzyme during infection. *J Virol*. doi:10.1128/JVI.00990-17

Ramiro-Ibañez F, Ortega A, Brun A, Escribano JM, Alonso C (1996) Apoptosis: a mechanism of cell killing and lymphoid organ impairment during acute African swine fever virus infection. *J Gen Virol* 77:2209–2219

Ravaomanana, J., Jori, F., Vial, L., Perez-Sanchez, R., Blanco, E., Michaud, V., et al. (2011) Assessment of interactions between African swine fever virus, bushpigs (*Potamochoerus larvatus*), *Ornithodoros* ticks and domestic pigs in north-western Madagascar. *Transbound Emerg Dis*, 58, 247-254.

Reis AL, Abrams CC, Goatley LC, Netherton C, Chapman DG, Sanchez-Cordon P, Dixon LK. (2016). Deletion of African swine fever virus interferon inhibitors from the genome of a virulent isolate reduces virulence in domestic pigs and induces a protective response. *Vaccine*. 34(39):4698-4705. doi: 10.1016/j.vaccine.2016.08.011.

Reis AL, Goatley LC, Jabbar T, Sanchez-Cordon PJ, Netherton CL, Chapman DAG, Dixon LK. (2017). Deletion of the African Swine Fever Virus Gene DP148R Does Not Reduce Virus Replication in Culture but Reduces Virus Virulence in Pigs and Induces High Levels of Protection against Challenge. *J Virol.* 30;91(24). pii: e01428-17. doi: 10.1128/JVI.01428-17.

Ribeiro, R., Otte, J., Madeira, S., Hutchings, G. H. & Boinas, F. (2015) Experimental Infection of *Ornithodoros erraticus sensu stricto* with Two Portuguese African Swine Fever Virus Strains. Study of Factors Involved in the Dynamics of Infection in Ticks. *PLoS One*, 10, e0137718.

Rendleman, CM and Spinelli, FJ (1994) The costs and benefits of African swine fever prevention. *Am J Agric Econ* 76:1255–125.

Rodriguez CI, Nogal ML, Carrascosa AL, Salas ML, Fresno M, Revilla Y (2002) African swine fever virus IAP-like protein induces the activation of nuclear factor kappa B. *J Virol* 76:3936–3942

Rodriguez F, Alcaraz C, Eiras A, Yanez RJ, Rodriguez JM, Alonso C, Rodriguez JF, Escribano JM (1994) Characterization and molecular basis of heterogeneity of the African swine fever virus envelope protein p54. *J Virol* 68:7244–7252

Rodriguez JM, Yanez RJ, Almazan F, Viñuela E, Rodriguez JF (1993a) African swine fever virus encodes a CD2 homolog responsible for the adhesion of erythrocytes to infected cells. *J Virol* 67:5312–5320

Rodriguez JM, Yanez RJ, Rodriguez JF, Viñuela E, Salas ML (1993b) The DNA polymerase encoding gene of African swine fever virus: sequence and transcriptional analysis. *Gene* 136:103–110

Rodriguez JM, Yanez RJ, Pan R, Rodriguez JF, Salas ML, Viñuela E (1994) Multigene families in African swine fever virus: family 505. *J Virol* 68:2746–2751

Rouiller I, Brookes SM, Hyatt AD, Windsor M, Wileman T (1998) African swine fever virus is wrapped by the endoplasmic reticulum. *J Virol* 72:2373–2387

Rowlands, R J (2008) African swine fever virus isolate, Georgia, 2007. *Emerg. Infect. Dis.* 14:1870–1874.

Ruiz-Gonzalvo F, Carnero ME, Bruyel V (1981) Immunological responses of pigs to partially attenuated ASF and their resistance to virulent homologous and heterologous viruses. In: Wilkinson PJ (ed) *FAO/CEC Expert Consultation in ASF Research*, Rome, pp 206–216

Ruiz-Gonzalvo, F, Rodriguez, F and Escribano, JM (1996) Functional and immunological properties of the baculovirus: expressed hemagglutinin of African swine fever virus. *Virology* 218:285–289

Salas ML, Kuznar J, Viñuela E (1981) Polyadenylation, methylation, and capping of the RNA synthesized in vitro by African swine fever virus. *Virology* 113:484–491

Salas ML, Kuznar J, Viñuela E (1983) Effect of rifamycin derivatives and coumermycin A1 on in vitro RNA synthesis by African swine fever virus. *Arch Virol* 77:77–80

Salguero FJ, Ruiz-Villamor E, Bautista MJ, Sanchez-Cordon PJ, Carrasco L, Gomez-Villamandos JC (2002) Changes in macrophages in spleen and lymph nodes during acute African swine fever: expression of cytokines. *Vet Immunol Immunopathol* 90:11–22

- Salguero FJ, Sánchez-Cordón PJ, Sierra MA, Jover A, Núñez A, Gómez-Villamandos JC (2004) Apoptosis of thymocytes in experimental African swine fever virus infection. *Histol Histopathol* 19:77–84
- Salguero FJ, Sánchez-Cordón PJ, Núñez A, Fernández de Marco M, Gómez-Villamandos JC (2005) Proinflammatory cytokines induce lymphocyte apoptosis in acute African swine fever infection. *J Comp Pathol* 132:289–302
- Sánchez-Cordón PJ, Ceron JJ, Nunez A, Martinez-Subiela S, Pedrera M, Romero-Trevejo JL, Garrido MR, Gomez-Villamandos JC (2007) Serum concentrations of C-reactive protein, serum amyloid A, and haptoglobin in pigs inoculated with African swine fever or classical swine fever viruses. *Am J Vet Res* 68:772–777.
- Sánchez-Cordón PJ, Jabbar T, Berrezaie M, Chapman D, Reis A, Sastre P, Rueda P, Goatley L, Dixon LK. (2018). Evaluation of protection induced by immunisation of domestic pigs with deletion mutant African swine fever virus Benin Δ MGF by different doses and routes. *Vaccine*. 36(5):707-715. doi: 10.1016/j.vaccine.2017.12.030.
- Sánchez, JA, Pierce, KE, Rice, JE, Wangh, LJ (2004) Linear-After-The-Exponential (LATE)-PCR: an advanced method of asymmetric PCR and its uses in quantitative real-time analysis. *Proc Natl Acad Sci* 101:1933–1938
- Sánchez-Vizcaino JM, Slauson DO, Ruiz Gonzalvo F, Valero MS (1981) Lymphocyte function and cell-mediated immunity in pigs with experimentally induced African swine fever. *Am J Vet Res* 42:1335–1341
- Sanchez-Vizcaino, J. M., Mur, L., Bastos, A. D. & Penrith, M. L. (2015) New insights into the role of ticks in African swine fever epidemiology. *Rev Sci Tech*, 34, 503-511.
- Sastre P, Pérez T, Costa S, Yang X, Räber A, Blome S, Goller KV, Gallardo C, Tapia I, García J, Sanz A, Rueda P. (2016) Development of a duplex lateral flow assay for simultaneous detection of antibodies against African and Classical swine fever viruses. *J Vet Diagn Invest*. 28(5):543-9.
- Sastre P, Gallardo C, Monedero A, Ruiz T, Arias M, Sanz A, Rueda P. (2016) Development of a novel lateral flow assay for detection of African swine fever in blood. *BMC Vet Res*. 12:206
- Schloer GM (1985) Polypeptides and structure of African swine fever virus. *Virus Res* 3:295-310
- Simon-Mateo C, Freije JM, Andres G, Lopez-Otin C, Viñuela E (1995) Mapping and sequence of the gene encoding protein p17, a major African swine fever virus structural protein. *Virology* 206:1140–1144
- Simeon-Negrin, RE and Frias-Lepoureau, MT (2002) Eradication of African swine fever in Cuba (1971 and 1980). In *Trends in emerging viral infections of swine* (eds A. Morilla, K. J. Yoon & J. J. Zimmerman), pp. 125–131. Ames, IA: Iowa State Press.
- Simulundu, E., Chambaro, H. M., Sinkala, Y., Kajihara, M., Ogawa, H., Mori, A., et al. (2017) Co-circulation of multiple genotypes of African swine fever viruses among domestic pigs in Zambia (2013-2015). *Transbound Emerg Dis*.
- Simon-Mateo C, Freije JM, Andres G, Lopez-Otin C, Viñuela E (1995) Mapping and sequence of the gene encoding protein p17, a major African swine fever virus structural protein. *Virology* 206:1140–1144
- Steyn DG (1928) Preliminary report on a South African virus disease amongst pigs.

13th and 14th Reports of the Director of Veterinary Education and Research, Union of South Africa, pp 415–428

Steyn DG (1932) East African virus disease in pigs. 18th Report of the Director of Veterinary Services and Animal Industry, Union of South Africa 1:99–109

Sumption KJ, Hutchings GH, Wilkinson PJ, Dixon LK (1990) Variable regions on the genome of Malawi isolates of African swine fever virus. *J Gen Virol* 71:2331–2340

Sun H, Jacobs SC, Smith GL, Dixon LK, Parkhouse RM (1995) African swine fever virus gene j13L encodes a 25–27 kDa virion protein with variable numbers of amino acid repeats *J Gen Virol* 76:1117–1127

Sun H, Jacobs SC, Smith GL, Dixon LK, Parkhouse RM (1995) African swine fever virus gene j13L encodes a 25–27 kDa virion protein with variable numbers of amino acid repeats *J Gen Virol* 76:1117–1127

Sun H, Jenson J, Dixon LK, Parkhouse ME (1996) Characterization of the African swine fever virion protein j18L. *J Gen Virol* 77:941–946

Sussman MD, Lu Z, Kutish GF, Afonso CL, Roberts P, Rock DL (1992) Identification of an African swine fever virus gene with similarity to a myeloid differentiation primary response gene and a neurovirulence-associated gene of herpes simplex virus. *J Virol* 66:5586–5589

Tabares E, Sanchez Botija C (1979) Synthesis of DNA in cells infected with African swine fever virus. *Arch Virol* 61:49–59

Tabares E, Marcotegui MA, Fernandez M, Sanchez-Botija C (1980a) Proteins specified by African swine fever virus. I. Analysis of viral structural proteins and antigenic properties. *Arch Virol* 66:107–117

Takamatsu H, Denyer MS, Oura C, Childerstone A, Andersen JK, Pullen L, Parkhouse RM (1999) African swine fever virus: a B cell-mitogenic virus in vivo and in vitro. *J Gen Virol* 80:1453–1461

Thomas LF, Bishop RP, Onzere C, Mcintosh MT, Lemire KA, de Glanville WA, Cook EA, Fèvre EM. (2016) Evidence for the presence of African swine fever virus in an endemic region of Western Kenya in the absence of any reported outbreak. *BMC Vet Res.* 12(1):192.

Thomson GR (1985). The epidemiology of African swine fever: the role of free-living hosts in Africa. *Onderstepoort J Vet Res* 52:201–209

Thomson GR, Gainaru MD, Van Dellen AF (1979) African swine fever: Pathogenicity and immunogenicity of two non-haemadsorbing viruses. *Onderstepoort J Vet Res* 46:149–154

Thomson GR, Gainaru M, Lewis A, Biggs H, Nevill E, van Der Pypekamp M, Gerbes L, Esterhuysen J, Bengis R, Bezuidenhout D, Condy J (1983) The relationship between ASFV, the warthog and *Ornithodoros* species in southern Africa. In: Wilkinson PJ (ed) African swine fever. ASF, EUR 8466 EN, Proceedings of CEC/FAO Research Seminar, Sardinia, Italy, September 1981, Commission of the European Communities, Rome, pp 85–100

Thoromo, J., Simulundu, E., Chambaro, H. M., Mataa, L., Lubaba, C. H., Pandey, G. S., et al. (2016) Diagnosis and genotyping of African swine fever viruses from 2015

- outbreaks in Zambia. Onderstepoort J Vet Res, 83, a1095.
- Titov I, Burmakina G, Morgunov Y, Morgunov S, Koltsov A, Malogolovkin A, Kolbasov D. (2017) Virulent strain of African swine fever virus eclipses its attenuated derivative after challenge. Arch Virol. 162(10):3081-3088
- Tulman E, Delhon GA, Ku BK, and Rock DL (2009) African swine fever virus. Curr Top Microbiol Immunol. 328:43-87
- Uttenenthal Å, Braae UC, Ngowi HA, Rasmussen TB, Nielsen J, Johansen MV. (2013). ASFV in Tanzania: asymptomatic pigs harbor virus of molecular similarity to Georgia 2007. Vet Microbiol. 165(1-2):173-6
- van Heerden, J., Malan, K., Gadaga, B. M. & Spargo, R. M. (2017) Reemergence of African Swine Fever in Zimbabwe, 2015. Emerg Infect Dis, 23, 860-861.
- van Oirschot, J. T. (1999). Classical Swine Fever (Hog Cholera). Disease of Swine. S. D. A. Barbara E. Straw, William L. Mengeling, K. Taylor Ames, Iowa, Wiley-Blackwell. 8th Edition: 159-172.
- Vilanova M, Ferreira P, Ribeiro A, Arala-Chaves M (1999) The biological effects induced in mice by p36, a proteinaceous factor of virulence produced by African swine fever virus, are mediated by interleukin-4 and also to a lesser extent by interleukin-10. Immunology 96:389–395
- Wang J, Wang J, Geng Y, Yuan W. (2017) A recombinase polymerase amplification-based assay for rapid detection of African swine fever virus. Can J Vet Res. 81(4):308-312.
- Wambura PN, Masambu J, Msami H (2006) Molecular diagnosis and epidemiology of African swine fever outbreaks in Tanzania. Vet Res Commun 30:667–672
- Wardley RC, Wilkinson PJ (1977) The association of African swine fever virus with blood components of infected pigs. Arch Virol 55:327–334
- Wardley RC, Wilkinson PJ (1980) Lymphocyte responses to African swine fever virus infection. Res Vet Sci 28:185–189
- Wilkinson PJ, Wardley RC, Williams SM. (1981) African swine fever virus (Malta/78) in pigs. J Comp Pathol. 91(2):277-84.
- Wilkinson PJ (1989) African swine fever virus. In: Pensaert MB (ed) Virus infections of porcines. Elsevier, Amsterdam, pp 17–35
- Wozniakowski, G., Kozak, E., Kowalczyk, A., Lyjak, M., Pomorska-Mol, M., Niemczuk, K., et al. (2016) Current status of African swine fever virus in a population of wild boar in eastern Poland (2014-2015). Arch Virol, 161, 189-195.
- Wu X, Xiao L, Lin H, Chen S, Yang M, An W, Wang Y, Yang Z, Yao X, Tang Z. (2018) Development and application of a droplet digital polymerase chain reaction (ddPCR) for detection and investigation of African swine fever virus. Can J Vet Res. 82(1):70-74.
- Xiao L, Wang Y, Kang R, Wu X, Lin H, Ye Y, Yu J, Ye J, Xie J, Cao Y, Wei Y, Liao D, Pan M, Lin Y, Dai Z, Li X. (2018) Development and application of a novel Bio-Plex suspension array system for high-throughput multiplexed nucleic acid detection of seven respiratory and reproductive pathogens in swine. J Virol Methods. 261:104-111.
- Yabe, J., Hamambulu, P., Simulundu, E., Ogawa, H., Kajihara, M., Mori-Kajihara, A., et al. (2015) Pathological and molecular diagnosis of the 2013 African swine fever

outbreak in Lusaka, Zambia. *Trop Anim Health Prod*, 47, 459-463.

Yanez RJ, Viñuela E (1993) African swine fever virus encodes a DNA ligase. *Virology* 193:531–536

Yanez RJ, Bournsnel M, Nogal ML, Yuste L, Viñuela E (1993a) African swine fever virus encodes two genes which share significant homology with the two largest subunits of DNA-dependent RNA polymerases. *Nucleic Acids Res* 21:2423–2427

Yanez RJ, Rodriguez JM, Bournsnel M, Rodriguez JF, Viñuela E (1993b) Two putative African swine fever virus helicases similar to yeast ‘DEAH’ pre-mRNA processing proteins and vaccinia virus ATPases D11L and D6R. *Gene* 134:161–174

Yanez RJ, Rodriguez JM, Rodriguez JF, Salas ML, Viñuela E (1993c) African swine fever virus thymidylate kinase gene: sequence and transcriptional mapping. *J Gen Virol* 74:1633–1638

Yates PR, Dixon LK, Turner PC (1995) Promoter analysis of an African swine fever virus gene encoding a putative elongation factor. *Biochem Soc Trans* 23:139S

Zani L, Nurmoja I, Breidenstein C, Leidenberger S, Martin B, Blome S. (2016). First evidence of an attenuated phenotype of genotype II African Swine Fever Virus in Estonia. 3rd Annual GARA scientific workshop. Ploufragan, France. September 6, 2016.

Zhang F, Hopwood P, Abrams CC, Downing A, Murray F, Talbot R, Archibald A, Lowden S, Dixon LK (2006) Macrophage transcriptional responses following in vitro infection with a highly virulent African swine fever virus isolate. *J Virol* 80:10514–10521

Zsak L, Onisk DV, Afonso CL, Rock DL (1993) Virulent African swine fever virus isolates are neutralized by swine immune serum and by monoclonal antibodies recognizing a 72-Kda viral protein. *Virology* 196:596–602

Zsak L, Lu Z, Kutish GF, Neilan JG, Rock DL (1996) An African swine fever virus virulence-associated gene NL-S with similarity to the herpes simplex virus ICP34.5 gene. *J Virol* 70:8865–8871

Zsak L, Caler E, Lu Z, Kutish GF, Neilan JG, Rock DL (1998) A nonessential African swine fever virus gene UK is a significant virulence determinant in domestic swine. *J Virol* 72:1028–1035

Zsak L, Lu Z, Burrage TG, Neilan JG, Kutish GF, Moore DM, Rock DL (2001) African swine fever virus multigene family 360 and 530 genes are novel macrophage host range determinants. *J Virol* 75:3066–3076

Zsak L., Borca M.V., Risatti G.R., Zsak A., French R.A., Lu Z., Kutish G.F., Neilan J.G., Callahan J.D., Nelson W.M., Rock D.L.. 2005. Preclinical diagnosis of African swine fever in contact-exposed swine by a real-time PCR assay. *J Clin Microbiol.*;43(1):112-9.