

非洲猪瘟

差距分析报告

2018年11月



全球非洲猪瘟研究联盟

全球非洲猪瘟研究联盟（GARA）旨在扩大全球 ASF 研究合作，最大限度地利用资源和专业知识，以实现其五个战略目标：

1. 促进研究合作，成为全球 ASF 研究领域的交流平台；
2. 开展战略研究，提升对 ASF 的认识；
3. 制定未来的 ASF 控制措施和策略，以供应用；
4. 确定未来 ASF 控制措施的社会和经济影响；
5. 为制定 ASF 流行区域动物和动物产品安全贸易政策提供依据。

关于 GARA 及其工作的更多信息，请访问网站：

<http://www.ars.usda.gov/GARA>。

ASF 差距分析报告的目的是评估目前的科学知识和可用的对策，使有疫情的国家能有效控制和减轻 ASF 疫情的影响，并为全球 ASF 控制和根除计划提供支持。

该 ASF 差距分析报告是 GARA 在其合作伙伴支持下组织的四次研讨会的报告汇编。

引用该报告：全球非洲猪瘟研究联盟(GARA)差距分析报告. 2018:

<https://go.usa.gov/xPfWr>

目录

摘要	4
研讨会照片	7
术语	9
简介	10
背景	12
全球非洲猪瘟研究联盟差距分析研讨会	12
参考资料	12
第一章 威胁的阐释	14
经济影响	14
流行病学	14
监测	15
生物安全	15
清群	15
疫苗	16
诊断	16
第二章 差距分析	17
第一节 病毒学	17
第二节 发病机理	24
第三节 免疫学	28
第四节 疫苗	33
第五节 诊断	36
第六节 流行病学	46
第七节 监测	48
第八节 野猪和野猪科动物	49
第九节 蜚媒	50
第三章 对策评估	51
假设	51
决策模型	51
第四章 建议	61
研究	61
储备	64
第五章 结论	65
图 1 非洲猪瘟病毒系统进化分析	66
表 I：2007-2018 年 ASF 疫情情况	67
表 II：NCBI 收录的 ASF 全基因组信息摘要	68
表 III：ASF 试验疫苗	69
表 IV：灭活 ASF 病毒的消毒剂	71
附件 I：对策工作组指南	72
附件 II：试验疫苗	74
附件 III：监测用诊断方法	76
附件 IV：疫病暴发时的诊断方法	78

附件 V：监测用实验室诊断方法.....	80
附件 VI：疫病暴发时的实验室诊断方法.....	82
附件 VII：翻译人员	84

摘要

2013 年至 2016 年，全球非洲猪瘟研究联盟 (GARA) 组织了四次科学会议，对我们目前的知识和现有兽医医疗对策进行差距分析，以有效控制和减轻由非洲猪瘟 (ASF) 暴发造成的影响。

从这些研讨会中得出的关键和一致的结论是，尽管 ASF 在历史上一直局限于非洲大陆，但在欧洲、北美、南美、欧亚大陆或亚洲引入 ASF 的风险是巨大的，并将对经济造成毁灭性的影响。非洲猪瘟是影响家猪和各种野猪的最复杂的病毒性疾病之一。软蜱被认为是生物贮主和传播媒介。非洲猪瘟病毒 (ASFV) 感染许多非洲疣猪和丛林猪群通常并不引起明显的临床症状。

目前，ASF 在撒哈拉以南 20 多个非洲国家呈地方性流行。自 2007 年高加索地区报告暴发疫情以来，又有 16 个国家宣布新发该病，受影响的国家包括格鲁吉亚、亚美尼亚、阿塞拜疆、俄罗斯、波罗的海国家以及东欧和中欧。这些国家的非洲猪瘟状况尚未改善，从而增加了 ASF 向其他国家传播的风险。2018 年，ASF 继续向西欧蔓延。2018 年，中国第一次报告了 ASF 疫情。

由于宿主因素众多、且 ASF 病毒分离株之间毒力差异很大，家猪 ASF 的初始临床症状是有所变化和不可预测的。病毒在疾病诱导、组织嗜性、宿主范围和免疫反应诱导等方面的机制尚不清楚。该病在临床上有几种形式，从急性致死到慢性疾病等。因此，临床诊断几乎是不可能的，必须辅以可靠的实验室工具。由高毒力毒株感染引发的抗体应答至少在感染后 7-14 天方可检测到，难以进行早期检测，也给监测计划带来挑战。不过，病毒基因组检测与抗体检测结合可以在潜伏期结束甚至更早一点时为该病提供可靠的诊断。

全球非洲猪瘟研究联盟认为下列对策是重要的，但也证实了若干缺陷的存在。

监测

立足于早期检测的常规监测是抗击疾病暴发的第一道防线。快速准确的检测有利于早期采取控制措施，降低疾病暴发的范围。ASF 病毒株的毒力高低不等，临床症状从在流行国家的无明显临床症状的持续感染，到在先前无疫国家的急性感染和严重疾病暴发，表现各异。由于 ASF 的流行病学和 ASF 病毒分离株间毒

力差异大等众多因素的影响，在非洲猪瘟无疫国家（如美国）家猪 ASF 的初始临床症状是变化和不可预测的。历史上实施的监测项目至少有两类：1）基于临床症状报告的“综合征”监测项目；2）基于实验室的监测项目，包括对风险群体的诊断检测。最近由于走私受污染饲料而导致 ASF 暴发的案例有力地证明，在实验室监测项目中，有必要增加一个新的检测和验证方法分枝，以检测食品、食品废弃物和农业加工产品中的 ASFV。然而，由于与样本大小相关的敏感性以及阴性结果不能说明任何事情，病毒基因组阳性结果也不能提供足够的信息来判断某一潜在因素的真实风险，因此需对这种检测谨慎考虑。

清群

清群是减少排毒和阻止 ASF 病毒传播的主要对策。最低限度的控制措施包括清除感染群体，在控制区内监测和限制移动以及监测与感染群接触过的动物群体。也可能清除接触群体和邻近动物群体，然而，这种控制方法造成了重大的经济影响，宰杀数以千计的动物也在伦理上引起了争议。在缺乏及时合理的补偿方案的情况下，扑杀效果是非常值得怀疑的。也就是说，在没有补偿的情况下，养猪人没有报告动机，他们会出售或宰杀猪只，进一步传播疫病。对于无法负担补偿的国家，有必要提出可持续和有效的扑杀替代方案。

生物安全

农场生物安全是防止 ASF 传入和传播的重要措施。通过控制猪、人、设备、用品以及 ASF 潜在的生物或机械携带者的移动，来实现高效的生物安全。优先的生物安全措施包括禁止泔水饲喂和限制垃圾猪，这对发展中国家可能是一个挑战。确定传染源和进入目标群体的途径是实施有效生物安全计划的关键步骤。然而，在实施了遏制该病传播的措施之后，ASFV 最可能的传播途径可能会发生改变。由于 ASFV 是一种虫媒病毒，尽管全面的生物安全措施应该包括昆虫和害虫控制，但当存在钝缘蜱时，生物安全计划应强化对设施清洗和消毒的程序。尽可能减少动物接触，运输卡车、人员以及化制企业收集死猪活动同样会导致该病在养殖场之间的传播。像非洲等地方性流行区域，商业养猪场的理想解决办法是采用生物安全隔离区划，这已在 ASF 控制区成功应用。

疫苗

目前还没有针对 ASFV 的商品化疫苗可用。事实上，也从未成功开发出一种有效的 ASF 商品化疫苗。虽然 ASF 还没有正式分型，但科学家们知道非洲猪瘟疫苗免疫后对异源毒株缺乏有效交叉保护。这是 ASF 学术界和兽医主管部门在考虑通过免疫策略来控制 and 根除 ASF 时需要解决的一个重要问题。如果考虑对野猪群进行疫苗接种，可能只有安全的减毒活疫苗才是可行的。

诊断

通常根据临床症状可判定疑似非洲猪瘟，因临床症状可能是非特异性的，难以与其他猪传染性疾病区分（如古典猪瘟）。病原学检测（如 PCR）与针对特定抗体的血清学检测方法（常用 ELISA）相结合可用于诊断。在工业化国家，两类检测方法都是商品化的，在感染后 3 至 4 天可以用 PCR 方法进行检测，感染后 7 至 14 天可用 ELISA 方法检测。目前还没有商品化的确诊试剂。

研讨会照片



第 1 届全球非洲猪瘟研究联盟差距分析研讨会
(梅岛动物疫病研究中心, 美国纽约, 2013 年 4 月 6-8 日)



第 2 届全球非洲猪瘟研究联盟差距分析研讨会
(Onderstepoort 兽医研究所, 南非比勒陀利亚, 2014 年 11 月 10-14 日)



第 3 届全球非洲猪瘟研究联盟差距分析研讨会

(食品、环境及劳动卫生署 (ANSES), 法国普罗夫拉冈, 2016 年 9 月 6-8 日)



第 4 届全球非洲猪瘟研究联盟差距分析研讨会

(动物疫病研究所, 意大利撒丁岛卡利亚里, 2018 年 4 月 11-13 日)

术语

AHT: 动物卫生技术员
APHIS: 动植物卫生检疫局
ARS: 农业研究服务署
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: 感染与免疫动物区分
FADDL: 外来动物疫病诊断实验室
GMP: 生产质量规范
HSPD-9: 国土安全总统指令-第9号
Ig: 免疫球蛋白
MLV: 修饰(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
qPCR: 实时 PCR
cPCR: 常规 PCR
PPE: 个人防护装备

简介

非洲猪瘟（African swine fever, ASF）是一种对家猪具有重要经济影响的传染性病毒病。在非洲，ASF 病毒（ASFV）可感染疣猪（*Phacochoerus africanus*）、丛林野猪（*Potamochoerus larvatus*, *P. porcus*）和大森林野猪（*Hylochoerus meinertzhageni*）等野猪而不表现明显的临床症状。钝缘软蜱是 ASFV 的贮主（Dixon 等, 2005）。

非洲猪瘟病毒是一种大型双链 DNA(ds)囊膜病毒,基因组大小约为 190Kb,其基因组结构和复制策略与其他大型双链 DNA 病毒（包括痘病毒科、虹彩病毒科和藻类 DNA 病毒科）相似。根据病毒粒子形态最初将 ASFV 归类为虹彩病毒科,随着对 ASFV 分子生物学的认知增多,现被重新归类为新的 DNA 病毒科即非洲猪瘟病毒科(非洲猪瘟及其相关病毒),是该病毒科的唯一成员(Costard 等, 2009)。

家猪感染非洲猪瘟病毒通常是致死性的,以发热、出血、共济失调和严重精神沉郁为特征。不过,感染过程也因宿主特点和特定毒株而有所差异。非洲猪瘟有多种临床表现,从高度致死型到亚临床感染。急性型 ASF 由高毒力毒株引起,以高热、皮肤发紫、多脏器出血、呼吸窘迫、共济失调等为特征,一般在感染后 3-7 天死亡,只有少数感染动物能存活下来。亚急性型和慢性型的特点是高热、步履蹒跚、咳嗽、腹泻、皮肤发绀、感染后 20 至 45 天死亡。由中等毒力或低毒力毒株感染引起的亚急性型和慢性型感染猪的存活率较高(Sanchez-Vizcaino 等, 2015a)。

非洲猪瘟以前仅在撒哈拉以南非洲国家发生。然而,在 1957 年 ASF 传入葡萄牙,后来又传入其他欧洲国家和中美洲及南美洲的一些国家。上世纪 90 年代末欧洲除意大利撒丁岛外,根除了 ASF。欧洲以外的其他受影响国家也实现了根除。但是,2007 年 ASF 一株强毒传入格鲁吉亚共和国,传入途径可能是波提港国际船舶上未经处理的残羹。随后,病毒(Georgia 2007)开始在外高加索地区传播,并传入俄罗斯。新传入的此次疫情对家猪和欧洲野猪都造成了影响。已证明该病对欧洲野猪与家猪一样易感,且在野猪群中能够维持自循环。这是前所未有的,因为以前除了与家猪共同感染并由家猪传播外,欧洲野猪群的感染都是自

限性的。2014 年，病毒从俄罗斯进一步扩散并传入欧盟其他国家。目前，波罗的海所有欧盟成员国、波兰、罗马尼亚、保加利亚、匈牙利和比利时都发生了 ASF。此外，捷克也发生了几起野猪疫情，但最近已宣布消灭。2018 年 8 月，ASF 传入中国（世界最大的生猪生产国）。这样在过去十年，ASF 就扩散到三大洲。因此，该跨界动物疫病的威胁目前已达到前所未有的地理范围，而且其需要多方合作的特性要求所有利益相关者参与防控措施制定（OIE，ASF 手册）。

目前，无 ASF 国家发生疫情时，在发病区域采取隔离和扑杀措施。此类措施尽管有效，但隔离和扑杀会造成巨大的经济损失（Arias and Sanchez-Vizcaino 2002）。目前还没有 ASF 疫苗可用。因此，到目前为止，检测和清除感染动物是控制和根除 ASF 的唯一方法（Costard 等，2009）。

背景

全球非洲猪瘟研究联盟差距分析研讨会

本差距分析报告是根据 2013-2018 年 GARA 组织科学会议期间进行的差距分析的报告进行汇编的：

第 1 届 GARA 科学会议，美国纽约，梅岛动物疫病研究中心，2013 年 4 月 6-8 日

第 2 届 GARA 科学会议，南非比勒陀利亚，农业研究院，2014 年 11 月 10-14 日

第 3 届 GARA 科学会议，法国普罗夫拉冈，食品、环境及劳动卫生署(ANSES)，2016 年 9 月 6-8 日

第 4 届 GARA 科学会议，意大利撒丁岛卡利亚里，动物疫病研究所，2018 年 4 月 11-13 日

根据 34 个不同国家的 44 个研究机构报告的最新研究进展并结合科学文献综述，ASF 专家分析确定了差距。利用这些信息，确定了 ASFV 研究的优先领域。

参考资料

GARA 推荐以下网站和报告作为 ASF 的生物学、流行病学和控制的背景信息：

1. <https://www.ars.usda.gov/GARA/> (GARA 官方网站)
2. <http://www.fao.org/docrep/004/y0510e/y0510e00.HTM> (FAO: 非洲猪瘟应急计划)
3. <http://www.oie.int/wahis/public.php?page=disease> (世界动物卫生信息系统)
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：非洲猪瘟发现与诊断)
6. <http://www.fao.org/ag/againfo/programmes/en/empres/ASF/index.html> (非洲猪瘟资源)
7. <http://web.oie.int/RR-Europe/eng/eng/Regprog/docs/docs/GF-TADs%20>

Handbook_ASF_WILDBOAR%20version%202018-09-25.pdf (野猪非洲猪瘟和狩猎生物安全手册)

8. <http://asf-referencelab.info/asf/en/procedures-diagnosis/sops> (欧盟非洲猪瘟参考实验室)

第一章 威胁的阐释

当前，非洲猪瘟（ASF）传播到新地区的威胁之大前所未有。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、欧洲以及目前在中国的持续传播，先前无疫国家传入ASF的威胁持续加大。可能的传入途径包括：1）进口的感染猪产品通过泔水饲喂给家猪；2）病毒由感染的家猪及野猪传播至新的国家或地区；3）有意或无意的违法事件。

经济影响

ASF传入非洲以外国家对养猪业产生了重要的经济影响。一个重要后果是国际贸易地位的丧失以及为根除该病而实施成本高昂的控制策略（Costard等，2009）。20世纪80年代该病传入古巴，导致了940万美元的经济损失（Simeon-Negrin and Frias-Lepoureau 2002, 2002）。西班牙仅在根除计划实施的最后5年耗资估计就达9200万美元（Arias和Sanchez-Vizcaino 2002）。1994年，Rendleman和Spinelli依据ASF对猪肉生产和贸易的影响及其根除成本，估计防止ASF传入美国的净收益将近4.5亿美元，相当于美国猪肉产品总销售额的5%。在流行国家，ASF对个体养殖者尤其是小规模养殖者和国家养殖业均具有巨大的经济影响（Fasina等，2012）。在非洲，这种影响也相当大，特别是对以养猪为生的无数贫困家庭的影响更大。

流行病学

由于风险因素的差异，非洲猪瘟可表现为不同的区域模式，应评估这些风险因素，以便制定合适的监测和控制策略。ASF的流行病学特点因家猪循环和森林-野外猪循环这两种传播循环类型而有所不同。至今，又增加了一个循环——环境循环，正如在波罗的海和中欧观察到的；病毒在野猪和环境中持续存在。由于宿主因素众多且ASF病毒分离株之间毒力差异很大，先前无疫国家的家猪感染ASF时初始临床症状是有所变化和不可预测的。此外，节肢动物媒介的存在也可影响病毒在环境中的维持。

监测

立足于早检测和早控制的监测是从源头消灭疫病的最重要对策。然而，对ASFV感染所产生的不同临床表现需要采用不同的监测策略。对于急性感染，可以基于临床症状进行监测；但对于ASF临床症状不明显的轻度感染或慢性感染，则必须在临床症状监测基础上，再以诊断试验作为补充。对许多国家来说，被动监测通常是唯一经济可行的方案，但由于难以将ASF与许多常见地方性传染病区分开来，因此也存在不足。通过针对生猪价值链上所有利益相关者的宣传活动和建立合理的补偿方案等来激励报告疫情，被动监测可以得到极大改善。主动监测项目费用昂贵，由于抗体检测存在困难和缺点，目前主动监测必须依靠直接诊断试验（如病毒分离和核酸检测）。

生物安全

实施生物安全措施是预防和保护商品猪场最重要策略之一，但还需要将具体措施纳入根除计划中，以防止疫病通过运输和人员接触进一步在本区域传播和跨区域传播。生物安全计划的主要目标是降低感染的概率，并显著降低与损失相关的成本（Fasina等，2012）。应采取一系列细致的动物卫生措施，以实现生物安全计划确定的目标。实施的措施越多，成本越高，但在预防疫病暴发的情况下，这些措施都是必要的（Fasina等，2012）。OIE《陆生动物卫生法典》（第15.1章、第4.3章和4.4章）提供了建立无ASF生物安全隔离小区的指南。

清群

清群是减少排毒和阻止 ASF 病毒传播的主要对策。最低限度的控制措施将包括清除感染群体，在建立的控制区内监测和限制移动以及监测与感染群接触过的动物群体。也可能清除接触群体和邻近动物群体。然而，这种控制方法造成了重大的经济影响，宰杀数以千计的动物也在伦理上引起了争议。在缺乏及时合理的补偿方案的情况下，扑杀效果也是非常值得怀疑的。也就是说，在没有补偿的情况下，养猪人没有报告动机，他们会出售或宰杀猪只，进一步传播疫病。在不太富裕的国家，缺乏资金来补偿畜主（特别是健康猪被扑杀的邻近场）是一个巨大挑战。对于无法负担补偿的国家，有必要提出可持续和有效的扑杀替代方案。实施清群策略时，对感染畜群的清群速度（包括尸体处理）和养殖场的消毒，可

能会对疫病传播、疫情持续时间和控制措施的整体效果产生影响（Boklund 等，2009）。在采用固定场所圈养家猪的国家或地区，清群措施是有效的；但在采用自由放养模式的家猪养殖地区，清群措施是很难实施的。

疫苗

目前还没有 ASF 疫苗可用，控制该病主要靠严格的动物检疫、生物安全措施和扑杀。这是在有效预防、控制或根除 ASF 疫情可用的兽医医学对策方面存在的主要差距。开发疫苗的一些技术难题如下：1) ASFV 是已知的最大 DNA 病毒之一，病毒绝大多数基因的特性和功能未知；2) 没有现成的细胞系可以培养 ASFV 用于疫苗生产；3) ASFV 有几种基因型，表型特征各异，迄今所测试的疫苗很少或没有交叉保护作用；4) 尽管已知非洲野猪对 ASF 病毒具有相当的抵抗力，但仍需要可用于家猪注射、可用于各种野猪口服的疫苗。

诊断

通常根据临床症状可怀疑 ASF，但临床症状可能是非特异性的，难以与其他流行性传染病和跨境动物疫病进行区分（如古典猪瘟）。实时和常规 PCR 与 ELISA 抗体检测同时使用是诊断该病的重要方式。对引起类似 ASF 症状的其他病原体进行血清学和病原学鉴别诊断至关重要。如果需要检测大量样本，ELISA 试验是首选方法。需要研制有用的现场检测方法，以便发生疫情时可在现场快速确定被检群体的状况。

第二章 差距分析

以下章节内容包括截至目前我们对非洲猪瘟病毒的了解、存在的知识差距及下一步的研究方向等进行的总结概述。

第一节 病毒学

非洲猪瘟病毒 (ASFV) 是一种大型的、有囊膜的、双链 DNA (dsDNA) 病毒, 基因组大约 190kb。ASFV 编码许多新的基因, 涉及到宿主的免疫应答调节、病毒对家猪的毒力及其在蜱虫媒介中复制和传播的能力。ASFV 与其他大型双链 DNA 病毒包括痘病毒科、虹彩病毒科和藻类去氧核糖核酸病毒科病毒具有相同的基因组结构和病毒自身复制策略 (Dixon 等, 2000 and 2008)。ASFV 和痘病毒均在细胞质中复制, 以分散的核周组装位点为主, 被称为病毒工厂。两者都表现出基因表达的时序调控, 具有相似的基因组结构, 包括末端颠倒重复、末端交联、中央保守区域以及位于基因组两端的可变区域 (Dixon 等, 2008)。虽然最初基于其病毒粒子的形态学特征将 ASFV 归于虹彩病毒科, 但随着对 ASFV 分子生物学认知不断增多, 现已将其重新划为一个新 DNA 病毒科的唯一成员, 即非洲猪瘟病毒科 (Asfar, 非洲猪瘟及相关病毒) (Dixon 等, 2000)。

ASFV 病毒粒子由 50 多个多肽组成, 电镜观察可见复杂但规则的结构, 呈二十面体对称且含有多个同心轴, 整体直径约为 200nm (Breese and DeBoer 1966; Carrascosa 等, 1984, 1985; Estevez 等, 1986 and 1987; Schloer, GM, 1985)。80nm 的病毒核心由类核体组成 (Andres 等, 1997 and 2002)。类核体外围有两个脂双层 (Andres 等, 1997 and 1998; Rouiller 等, 1998)。内膜外是衣壳, 由约占病毒粒子蛋白含量 1/3 的结构蛋白 p72 (也称为 p73) 组成, 并形成病毒粒子的二十面体结构 (Andres 等, 1997; Carrascosa 等, 1986; Garcia-Escudero 等, 1998; Tabares 等, 1980a)。衣壳外覆有松散的外膜, 系在病毒粒子出芽过程中形成, 在病毒感染过程中并不需要它 (Andres 等, 2001; Breese and DeBoer 1966; Carrascosa 等, 1984; Moura Nunes 等, 1975)。

与痘病毒粒子类似, ASFV 病毒粒子包含酶活性, 在病毒复制早期及病毒在宿主细胞质复制过程发挥关键作用, 包括 RNA 聚合酶、三磷酸核苷酸水解酶、拓扑异构酶、mRNA 加帽以及蛋白激酶活性 (Kuznar 等, 1980 和 1981; Polatnick 1974; Salas 等, 1981 和 1983)。

据报道, 在家猪疫情中分离到的非洲猪瘟病毒株之间的基因组异源性, 与从蜱虫体内分离到的毒株具有关联性 (Dixon 和 Wilkinson, 1988; Sumption 等 1990)。随后利用部分 p72 基因进行的分子进化研究支持了其中一些发现, 包括西非、欧洲和美国分离株之间的相对同源性, 家猪疫情分离株某些谱系的同源性, 以及南部非洲和东部非洲分离株之间的相对异源性 (Bastos 等, 2003; Lubisi 等, 2003; Wambura 等, 2006)。

不过, ASFV 蛋白在不同的分离株间是相当保守的。已证实不同病毒分离株的中央基因组核心区非常保守。这包括已知的病毒粒子膜蛋白和其他结构蛋白以及最近研究发现会影响感染细胞中病毒粒子形成过程的蛋白 (Afonso 等, 1992; Alcami 等, 1992 and 1993; Brookes 等, 1998b; Camacho and Viñuela 1991; Lopez-Otin 等, 1988 and 1990; Munoz 等, 1993; Rodriguez 等, 1994; Simon-Mateo 等, 1995; Sun 等, 1995 and 1996)。其他 ASFV 编码的蛋白序列与宿主细胞蛋白或酶相似, 包括与核苷酸代谢、DNA 复制和修复、转录和蛋白质修饰相关蛋白, 以及那些可能导致 ASFV 病毒粒子产生酶活性或在感染细胞中诱导产生酶活性的蛋白 (Baylis 等, 1992, 1993a; Blasco 等, 1990; Bournnell 等, 1991; Freije 等, 1993; Hammond 等, 1992; Lu 等, 1993; Martin Hernandez and Tabares 1991; Martins 等, 1994; Rodriguez 等, 1993b; Yanez 1993; Yanez 等, 1993a, 1993b and 1993c)。这些蛋白中有一些似乎与痘病毒中已发现的蛋白有远亲关系 (Baylis 等, 1993b; Blasco 等, 1990; Bournnell 等, 1991; Freije 等, 1993; Martin Hernandez and Tabares 1991; Roberts 等, 1993; Yanez 等, 1993b)。此外, ASFV 基因组编码的其他酶组件, 包括细胞泛素偶联酶、反式异戊二烯基转移酶、NifS 样蛋白以及碱基切除修复通路的组成部分 (Hingamp 等, 1992; Rodriguez 等, 1992)。ASFV 还编码一些蛋白, 预测其能够介导病毒-宿主间相互作用、改变病毒毒力、增强病毒在宿主细胞内复制能力, 包括细胞凋亡抑制剂 (IAP) 的同源物、Bcl-2、I Kappa B (IKB) 髓系分化原反应抗原 MyD116, 凝集素样蛋白和 CD2 家族蛋

白 (Borca 等, 1994b; Neilan 等, 1993a; Rodriguez 等, 1993a; Sussman 等, 1992)。值得注意的是, 这些假定与病毒毒力或宿主范围相关的蛋白, 连同某些多基因家族 (MGF) 蛋白、中央可变区蛋白 9-RL (标注为 BA71V 的 pB602L 基因) 和含有可变串联重复序列的结构蛋白 p54 (pE183L 基因) (Irusta 等, 1996; Rodriguez 等, 1994; Sun 等, 1995), 也是在多个分离株中变异性最大的。

近来, 一些研究报道了之前未定性或部分定性的几种病毒蛋白的功能。其中一些蛋白在病毒复制过程中起着关键作用, 如 E2 泛素偶联酶 I215L (Freitas 等, 2018)、病毒脱壳酶 D250R 或 g5R (Quintas 等, 2017)、病毒组蛋白 pA104R (Frouco 等, 2017)、诱导凋亡蛋白 A179L (Banjara 等, 2017)、病毒拓扑异构酶 II 蛋白 (Freitas 等, 2016) 以及功能未知的病毒蛋白 Ep152R, 先前研究证实该蛋白能与宿主蛋白 BAG6 的特异性结合 (Borca 等, 2017) 为病毒复制所必需。

病毒的复制过程在过去几年也受到了人们的关注。除了上述必要的病毒蛋白外, 细胞受体 CD163 在猪巨噬细胞培养和猪体内复制过程中介导病毒感染的关键作用已经得到揭示。利用遗传学方法敲除 CD163 分子的转基因猪在病毒易感性方面与正常猪没有区别, 并且对 ASFV 完全易感 (Popescu 等, 2017), 这表明至少有另一种入侵易感细胞的替代途径存在。此外, 细胞囊泡系统 (Custa-geijo 等, 2012, 2016, 2017) 与泛素蛋白酶系统 (Barrado Gil 等, 2017) 一样在病毒复制过程中扮演重要角色。

差距

虽然病毒只有一个种, 但目前已经出现了 24 种基因型, 其中基因型 23 和 24 分别于 2017 年和 2018 年被发现 (Achenbach 等, 2017; Quembo 等, 2018); 然而, 这种命名只是基于单个基因的测序结果。已经证实 p54 基因的全基因组测序是又一种有价值的基因分型方法, 可用于分子流行病学研究。通过分析中心可变区 (CVR) 内的 b602l 基因可进一步区分病毒, 该区域被描述为可区分密切相关的分离株和识别 24 个基因型中不同病毒亚群的最可变的区域 (Gallardo 等, 2009)。已知不同 ASF 病毒株在基因组大小、毒力和免疫原性 (无交叉保护) 方面存在着显著差异, 但对负责病毒毒力、宿主特异性以及病毒-媒介-宿主互作的具体基因还知之甚少。

缺乏 ASFV 基因组的可用序列及 ASFV 易感物种的宿主基因组信息

另外一个重要的差距是缺乏 ASFV 可用基因组的序列和 ASFV 易感物种的基因组信息。目前,存储在公共数据库中的 ASFV 分离株的全基因组序列非常少,在 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 中仅有 19 条记录。这些毒株的汇总信息如表 2 所示,包括它们的收集日期、来源国家和宿主。这些非常有限的分离株序列数据 6 个来自蜚虫、10 个来自家猪、1 个来自疣猪、1 个来自野猪。缺乏分离毒株序列信息的多样性只能对不同毒株之间的差异进行有限的分析。从已有的 ASFV 全基因组序列发现,主要缺少:

- 1) 来自不同地区和宿主的分离株,包括家猪、野猪、疣猪和蜚;
- 2) 自然发生或实验室致弱毒株;
- 3) 随着时间和距离变化,分离毒株在流行地区发生的进化;
- 4) 当前非洲疫情的野外毒株。

在普卢夫拉冈(法国)会议上提到了一个有趣的信息,即在爱沙尼亚发现了 II 型 ASFV 减毒株(Zani 等, 2016)。该株病毒是从一头处于临床感染阶段的实验攻毒野猪中重新分离出来的。受感染动物随后恢复,并且在试验结束时检测病毒为阴性而特异性抗体呈阳性。将该存活的野猪与哨兵猪混合饲养并没有导致疫病传播,尽管事实上那头野猪在混合时仍然是病毒基因组阳性。进一步用该毒株对小型猪、家猪和欧洲野猪进行了体内攻毒试验。虽然先前试验症状非常轻微,而这次所有野猪都表现出急性致死性病程。对其基因组测序分析发现,该毒株在其基因组的 5'末端出现较大的缺失和重组现象。进一步研究正在进行,但对毒株能引发轻微病程的事实应提高警惕。

有趣的是,该变异病毒在该地区只持续了很短的一段时间,表明其在疫病循环中存在某种缺陷。其他波罗的海国家也报告发现了类似的减毒毒株,值得深入研究。

易感物种的基因组是 ASFV 研究中的又一主要差距。虽然 NCBI 收录有猪的 14 个单独基因组信息,但在非洲和欧洲疫情发生地区,家猪、野猪及疣猪的基因组序列在很大程度上仍然是未知的。为通过基因组研究来明确导致抗性猪产生的因素,需要进行大规模的测序工作。主要的知识空缺包括地方性流行或有疫情地区的家猪和野生猪的种和亚种情况,以及能够在疫情暴发中存活下来的动物的

基因组序列。

尽管已被证明新一代测序技术的最新进展对 ASFV 和宿主基因组的测序具有优势，但问题依然存在，主要原因是不仅在采样方面，而且在测序和组建这些大型基因组方面涉及大量成本和工作量问题。对于 ASFV 基因组测序，更好的方案是将病毒 DNA 与宿主 DNA 分开进行，从而使测序工作更容易、更具成本效益。没有这些信息，功能基因组研究只能仅限于单个实验室使用的特定毒株。随着这些信息变得更加容易获得，必将会更好地预测分离株之间的潜在交叉保护以及病毒在时间和发病群间的进化关系。

在不同感染阶段 ASFV 和宿主的转录组学

ASFV 具有 150-170 个开放阅读框（ORF），但是这些 ORF 中的大多数仅是预测，很少有关于 RNA 或蛋白水平的实验证据。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不同分离株而异，并且因感染宿主的不同而不同，这也可以解释 ASFV 感染后会有从 100%死亡率到亚临床感染的不同结果。但是，到目前为止，即使是在实验或体外水平，也还没有关于 ASFV 表达基因的 RNA 或蛋白质谱的公开信息。

普卢夫拉冈（Jaing 等，2016）会议上发表了对猪感染低和高致病性 ASFV 后全血 RNA 表达谱的分析结果。RNAseq 分析发现，在感染高致病性 Georgia 2007 毒株实施安乐死的动物中，表达差异量最大的基因达 395 个，而在用弱毒 OURT88/3 毒株攻毒 7 天后采血动物中，181 个基因的表达量改变。在两组之间具有最高差异表达的前 20 个常见基因是与巨噬细胞标志、天然杀伤细胞标志、趋化因子和其他重要免疫应答标志相关的基因。

目前还不清楚介导病毒感染猪巨噬细胞的具体受体。也有可能是多个分子作为受体或协同受体参与了病毒感染过程。作为候选受体基因之一的 CD163 是成熟巨噬细胞表达的一种清道夫受体，在 ASFV 感染过程中参与协助病毒进入细胞。然而，使用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术得到的 CD163 突变猪做实验表明，缺乏 CD163 基因的重组猪仍然容易感染，并且没有观察到病毒毒力出现变化，说明 CD163 不是 ASFV 的受体（Popescu 等，2017）。使用源自野猪的稳定细胞系（WSL）来培养一些 ASF 适应性分离株，被视为一种有效的工具。将成功传代后分离出的毒株用于全基因组测序，证实基因组没有出现大的缺失现象（Keil 等，2016）。

这些新的报告增加了对病毒感染机制的认识,并将有助于了解病毒诱导宿主细胞的免疫机制和鉴定新的候选疫苗。然而,充分阐明和理解在细胞水平上病毒与宿主如何相互作用还需要新的实验数据支持。

其中一个主要的知识缺口是宿主细胞感染 ASFV 后的基因整体表达图谱尚未完全确定。该信息可用于确定宿主如何对病毒感染做出应答,以及在病毒感染期间激活或抑制相关信号分子通路。这些类型的试验可用于比较宿主细胞对不同毒株的反应,例如将减毒的 ASFV 病毒株与亲本毒株引起宿主细胞的反应进行比较。这些信息可以指引我们更好地了解自然发生的或实验室产生的弱毒株。了解这一信息有助于理解这些病毒株是如何致弱的。一旦在细胞水平上了解了宿主细胞应答,就可以收集这些信息并将其应用于宿主对病毒的应答。

增加对 ASFV 和感染 ASFV 的宿主的转录组学的了解,将更好地理解 ASFV 毒株的变异性以及不同病毒分离株与不同物种之间的宿主免疫应答的差异。

ASFV 蛋白的功能基因组学

大多数 ASFV 编码的蛋白,经实验证实其功能的很少;功能基因组学主要局限于通过保守的蛋白质序列或其他病毒科或宿主蛋白结构域预测其功能。缺乏实验证实其功能是 ASF 研究的主要问题。理解 ASFV 蛋白在感染过程中的作用对于理解 ASF 的发病机制至关重要,也对理解 ASFV 如何能够逃避宿主免疫系统识别而引发疾病具有重要意义。对 ASFV 任何特定蛋白的功能了解不能仅限于预测,而识别病毒和宿主细胞两者相互作用的蛋白分子是 ASFV 研究的主要空白。迄今为止,关于宿主-病毒蛋白相互作用的报道很少。

在法国 Ploufragan 的 GARA Gap 分析研讨会上发布了一些相关的最新信息,指出之前未揭示的 ASFV Ep152R 的基因功能及其与宿主胞内蛋白 Bag6 的相互作用 (Borca 等, 2016)。同时发布了确证病毒脱壳并进入细胞的机制是通过内吞作用和一些参与此过程的宿主细胞分子 (Cuesta-Geijo 等, 2016)。另外,他们报告了之前未被发现的天然先天免疫机制与干扰素诱导的蛋白质有关,这些蛋白质能够抑制病毒从 IFITM 蛋白内体进入细胞质 (Muñoz-Moreno 等, 2016)。此外,报道了纯化 ASFV 病毒颗粒的方法及采用质谱分析胞外成熟病毒蛋白组学特征的方法,并且还提到鉴定出了新的病毒和宿主衍生的 ASFV 结构蛋白 (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 如何逃避宿主的免疫应答，对于研发及设计出合理的弱毒活疫苗至关重要。大规模功能基因组研究是这一差距的重要组成部分，可以通过直接的蛋白质-蛋白质鉴定方法（如酵母双杂交）或共免疫沉淀（Co-IP），再结合质谱方法进行分析。纯化病毒蛋白并进行体外实验以验证其功能，具有额外的研究价值。

通过宿主基因组筛选来确定 ASFV 的毒力因子

依靠当今的技术，已经完成了对许多病毒的大规模基因组筛选，但至今还没有关于 ASFV 的筛选报告，表明在 ASFV 研究中存在的巨大空白。这种基因组筛选需要猪特异性试剂，如通过 siRNA 或 CRISPR / Cas9 进行基因功能筛选都需要猪的基因组文库。这些猪特异性文库的开发对开展可靠的 ASFV 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信号通路途径，并有可能发现病毒与细胞之间特异性结合受体、病毒感染的免疫标志以及病毒复制和病毒毒力所涉及的宿主信号通路。该信息将有助于了解病毒对细胞的趋向性，找出适合细胞复制的细胞系从而提高对病毒发病机制的认识。

研究需求

1. ASFV 基因组序列：

利用目前的 DNA 测序技术，对以下病毒进行全基因组测序将相对容易和便宜：1) 每个基因型 1-3 个分离株；2) 一系列具有不同毒力的病毒 (> 10)；3) 一系列仅在家猪、野猪和獐中复制的病毒 (> 5)。

2. ASFV 生物信息学资源：

对 ASFV 基因组继续进行新的注释和分析是有必要的。ASFV 的基因数据量很大，需要专门的工具去分析。对获得更多基因组序列的需求将使得基因的管理和比较更加复杂。尽管 ASFV 有大量可用的测序数据，但使用当前非常强大的技术，已经有可能开发出一个综合数据库，将大量分离株的全基因组序列包含在内，以取代目前意义不大的基于基因分型的分类：

<https://virology.uvic.ca/orgms/dsdnaviruses/asfarviridae/>

3. 针对猪基因组的 CRISPR/Cas9 或 siRNA 文库

开发猪特异性基因敲除文库，对体外筛选 ASFV 基因组至关重要。猪基因组

文库对于 ASFV 的宿主基因组筛选非常有价值，具有广泛的实验用途，可用于发现潜在的受体，用来调节免疫逃避或增加病毒毒力的途径。

4. 病毒转录组研究

使用现代技术，无论是 RNA 水平上的还是蛋白水平上的 ASFV 基因组表达数据，都相对容易获得，并可用来确定在不同宿主体内和体外 ASFV 基因表达的差异。

第二节 发病机理

非洲猪瘟病毒感染家猪会有几种不同形式的临床表现，包括从高致死的急性型表现到亚临床型表现，不同临床表现取决于病毒和宿主 2 个因素 (Tulman 等, 2009)。在非洲，高致病性毒株对流行地区的猪群造成广泛影响。在群体水平，感染可导致 50-100% 的猪血清转阳，但并不表现发病迹象，急性发病死亡猪的比例会有不同。与家猪不同，感染 ASFV 的野猪一般不表现临床症状，且病毒血症的病毒滴度低 (Heuschele 和 Coggins, 1969; Montgomery, 1921; Plowright, 1981; Thomson, 1985)。ASF 呈现的这些特征与其他猪病 (例如丹毒和经典猪瘟) 的临床表现相似，仅依靠临床表现开展非洲猪瘟监测存在一定问题。

非洲猪瘟通常通过口鼻途径发生感染，病毒入侵后首先在扁桃体中复制，接着产生病毒血症并随后在血淋巴系统的所有器官中进行继发复制。急性型 ASF 潜伏期为 5 至 15 天。感染动物表现发热和厌食，其次是皮肤充血和发绀、呼吸和心率增加、流涕、共济失调、呕吐，最后昏迷死亡。不同形式临床表现的 ASF 都可以观察到出血现象，包括鼻出血、粪便发黑、便血和呕血。感染不同 ASFV 毒株后动物的存活时间为 2 至 9 天 (Conceicao 1949; Creig 和 Plowright 1970; Haresnape 等, 1988; Mendes 1961; Thomson 等, 1979; Howey 等, 2013)。急性型 ASF 的典型临床病理学表现包括白细胞减少症 (Detray 和 Scott 1957; Edwards 等, 1985; Wardley 和 Wilkinson, 1977)，B 和 T 细胞淋巴细胞减少症 (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)。组织学病变可包括淋巴结、脾、肾、呼吸道和胃肠道出血, 皮肤和浆膜充血, 严重的出现小叶间肺水肿 (interlobular lung edema), 以及可能出现纤维素性到出血性体腔积液 (cavitary effusions) (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; Howey 等, 2013)。受侵害的组织广泛坏死以及严重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 还能诱导急性期蛋白的显著变化 (Carpintero 等, 2007; Sanchez-Cordon 等, 2007)。亚急性病例病程持续 3-4 周, 最突出的症状包括间歇性发热、消瘦、肺炎、呼吸困难、心功能不全和关节肿胀。虽然可能发现淋巴结和其他组织的出血, 但没有急性 ASF 那么严重 (Moulton 和 Coggins, 1968a)。能被 ASFV 感染的原代细胞属于单核-吞噬细胞系统的细胞类型, 包括固定组织巨噬细胞 (fixed tissue macrophages) 和网状细胞的特定谱系 (Colgrove 等, 1969; Konno 等, 1971a 和 1971b; Mebus 1988; Moulton 和 Coggins 1968a)。被高毒力病毒株感染后, 感染组织表现出广泛损伤。中等毒力 ASFV 毒株似乎也感染这些细胞类型, 但组织感染程度和由此导致的组织损伤严重程度要轻得多。在猪体内, ASFV 能在许多猪组织的巨噬细胞中复制并有效诱导显著细胞病变的能力可能是体现 ASFV 毒力的关键因素 (Howey 等, 2013)。

已经证实基因 I 型减毒分离株能长期持续感染猪 (Wilkinson 1984; Carrillo 等, 1994)。已证实低毒力基因 I 型 NH/P68 分离株感染猪可以持续传染给与之接触的猪 (Gallardo 等, 2015)。低毒力分离株可引起慢性型 ASF, 其特征是缺乏典型急性型病变和低死亡率, 但是临床表现不同, 包括生长迟缓、消瘦、关节肿胀、皮肤溃疡和常见的继发细菌感染等 (Sanchez-Vizcano 2015)。已证明感染后存活的猪在组织或血液中可以长时间携带病毒, 从而可能导致病毒传播、疫病持续存在、零星暴发和疫病突然再复发 (Costard 等, 2013; Gallardo 等, 2015 年)。非洲的一些研究表明可在表面健康的猪只中检测出 ASFV 核酸 (KalenziAtuhaire 等, 2013; Thomas 等, 2016), 这些猪组织中可经 PCR 检测到 ASFV 阳性, 但是血液经 PCR 和血清学检测均为阴性 (Okoth 等, 2013; Abworo 等, 2017)。持续带毒动物传播疫病给幼龄动物的实验证据有限, 在野外, 持续

带毒动物作为 ASF 携带者的相关性尚不清楚，但健康动物感染带毒的数据在不断增加（Titov 等，2017，Abworo 等，2017，Thomas 等，2016，Muhangi 等，2015，Braae 等，2015，Athuaire 等，2013），表明该病毒可以在康复猪中存活很长一段时间，并且可能会在以后出现毒力增强（Titov 等，2017）。

据报道，疣猪和家猪在 ASF 急性感染存活后能出现持续带毒现象（DeKock 等，1940；Detray 1957；Plowright 等，1969）。在实验条件下，长期持续带毒是 ASFV 家猪感染带来的后遗症（低剂量肌肉注射 E75-L7、E75-CV1 和 E75-L7 两次攻毒、E75-CV1 和 E75-L7 一次攻毒）（Carrillo 等，1994）。这些动物在病毒接种后超过 500 天仍能通过 PCR 在外周血单核细胞中检出病毒 DNA；然而，从这些样品中分离不到感染性病毒，并且从未证实能传播该病。虽然从血液中能检测到病毒基因组（至少在接种后 90 天）是与其他许多报道一致的（McVicar 1984；Mebus 和 Dardiri，1980；Carrillo 等，1994；Gallardo 等，2015；Carvalho Ferreira 等，2012），但是在较短时间内使用不同基因型的中等毒力分离毒株攻毒的数据并不支持感染后存活的动物就一定会成为病毒携带者（Petrov 等，2018）。

在撒哈拉以南非洲地区，ASFV 在野猪（疣猪）和钝缘软蜱之间的圆弧循环中持续存在（Plowright 等，1969a 和 1969b；Thomson 等，1983；Wilkinson 1989）。然而，其他野猪如丛林猪不在洞穴中栖息，因此很可能通过直接传播感染 ASFV，尽管这种情况的证据有限（Jori 和 Bastos 2009；Jori 等，2013）。与家猪不同，感染 ASFV 的野猪一般不表现临床症状，且病毒血症中病毒滴度低。（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呈血清阳性，且可能是持续感染。与疣猪一样，丛林猪通常呈亚临床感染，与家猪相比，对直接接触传播的抵抗力更强；然而，ASFV 病毒血症的持续时间可能会更长（Anderson 等，1998）。虽然家猪、疣猪和丛林猪体内血液白细胞中的 ASFV 复制相似，但与家猪相比，丛林猪中 ASFV 复制、扩散和对体内淋巴细胞凋亡的诱导会小些（Anderson 等，1998；Oura 等，1998a 和 1998b）。

已有一些关于 ASFV 基因在病毒毒力中作用的描述。越来越多的研究表明末端基因组区域和多基因家族（MGF）基因在 ASFV 感染宿主中起重要作用。涉及核苷酸和核酸代谢的 ASFV 蛋白已经证明与巨噬细胞宿主范围有关，并且类似

于其他大型 DNA 病毒，可以提供脱氧核苷酸库，有利于病毒在特定细胞类型内高效复制。从 ASFV 中缺失 dUTPase (E165R 基因) 和胸苷激酶 (K196R 基因) 基因会降低其在巨噬细胞中复制的能力，并减弱其感染猪的能力；同样，巨噬细胞宿主范围与病毒毒力相关 (Moore 等, 1998)。

另外，一些 ASFV 基因或基因区域与家猪的病毒发病机制和毒力相关，但不影响体外巨噬细胞的病毒复制。其中 UK (DP96R) 和 23-NL (DP71L 或 114L) 这两个基因位于基因组的相邻位置。UK 是一种早期蛋白，与其他已知蛋白缺乏相似性，不同病毒分离株之间差别很大，并且如果从致病性 ASFV 中缺失 UK 基因，尽管其在体外不影响病毒在巨噬细胞中生长，但是病毒对猪的致病力显著减弱 (Zsak 等, 1998)。另一个基因是 23-NL 基因，编码的 NL a 蛋白，与细胞 MyD116 和单纯疱疹病毒神经毒力因子 ICP34.5 相似 (Sussman 等, 1992; Zsak 等, 1996)。从 ASFV E70 株中缺失 NL 基因可减弱病毒对猪的致病力，而在体外不影响病毒在巨噬细胞中的复制。

6 种 MGF360 基因和 2 种 MGF530 基因的大片段缺失能显著降低病毒在巨噬细胞中的复制能力 (Neilan 等, 2002)。最近研究已经表明，这些缺失无论是在适应已建立的细胞系生长的过程中自然形成的 (Krug 等, 2015 年)，还是通过遗传操作引入的 (O'Donnell 等, 2015b; Reis 等, 2016; Sanchez-Cordon 等, 2016)，都与实验性感染中病毒毒力的降低密切相关。完全致弱的病毒分离株 Georgia 2007 (O'Donnell 等, 2015b) 和 Benin (Reis 等, 2016; Sanchez-Cordon 等, 2016) 能够诱导对同源病毒攻毒的可靠保护。

此外，最近已经对一种新基因，DP148R 进行了特性研究 (Reis 等, 2017)。在干扰素应答调节中，该基因与 MGF360/530 基因相似，如果缺失该基因，会降低 Benin 分离株对猪的毒力，并能诱导针对同源病毒攻击的保护。

这些研究为提升我们对 ASFV 发病机制分子基础的理解，以及病毒蛋白在疾病预后中的特殊作用做出了重要贡献。

差距

慢性型 ASF 的发病率和死亡率低于急性型和亚急性型 ASF，急性型感染猪只出现强烈组织损伤和淋巴衰竭等严重炎性变化会引起猪只死亡。了解由低毒力 ASFV 分离株引起的慢性型 ASF 的致病机制研究可以提供有用的信息。动物感

染后存活的机制尚不清楚，包括带病毒动物出现的保护性免疫应答机制。

通过遗传操作或通过适应不同细胞系获得的减毒株为研究病毒减毒机制提供了有价值的工具。使用亲本毒株与其衍生的减毒株进行宿主和病毒特性的比较分析，特别是关注感染的早期阶段，将提供关于导致病毒减毒的宿主和病毒机制的关键数据。特别有趣的是可以使用仅有单个基因不同的有毒力毒株/减毒株进行研究，能消除不同病毒株之间由于不同遗传背景产生的干扰。应当在感染每种配对病毒的猪中分析病毒复制模式、动力学和微观及宏观病理学变化的严重性以及宿主基因激活模式的差异。

ASFV 病理学基础知识的重大差距包括：

- 1) 控制动物间感染的基本机制。
- 2) 分析宿主-病毒相互作用过程中的不同方面，特别是在早期（初次）感染期间。
- 3) 不同毒力病毒诱导发病过程中的分子差异。
- 4) 特定基因决定簇在疫病预后中的作用。

研究需求

- 1) 控制宿主间感染的基本因素，包括家猪和野猪以及节肢动物之间。
- 2) 研究不同易感宿主中不同毒力 ASFV 分离株的发病机制，以识别并控制早期感染。
- 3) 评估接触感染动物实验中，不同毒力 ASFV 毒株的传播率。
- 4) 确定宿主免疫相关基因的激活模式，特别是在感染后的早期阶段。
- 5) 鉴定涉及宿主范围、毒力和致病性的 ASFV 基因和遗传决定簇（多基因家族等基因组）。

第三节 免疫学

开发安全有效ASF疫苗的关键障碍是缺乏相关免疫学知识。用感染非洲猪瘟病毒的细胞提取物、感染ASFV的猪外周血粒细胞上清液、纯化和灭活的病毒颗粒、戊二醛固定的感染的巨噬细胞或用去污剂处理的感染的肺泡巨噬细胞接种动物，均不能诱导保护性免疫（Coggin 1974；Forman等，1982；Kihm等

，1987；Mebus 1988）。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变异株接种后，急性感染存活的猪对同源病毒攻击产生长期抗性，但对异源病毒的抵抗力却很弱（Hamdy and Dardiri 1984；Ruiz-Gonzalvo等，1981）。用毒力基因/宿主相关基因缺失的ASFV减毒株免疫猪只，可对同源亲本强毒的攻击起到保护作用（Lewis等，2000；Moore等，1998；Zsak等，1996 and 1998）。体液和细胞免疫是ASF保护性免疫应答的重要组成部分。抗ASFV的抗体足以保护猪免受致死ASFV的感染（Hamdy and Dardiri 1984；Onisk等，1994；Ruiz-Gonzalvo等，1981）。虽然已有针对病毒蛋白p30、p54和p72的ASFV中和抗体的相关报道（Borca等，1994a；Gomez-Puertas等，1996；Zsak等，1993），但它们不足以产生抗体介导的免疫保护（Neilan等，2004）。CD8+淋巴细胞也在ASFV感染的保护性免疫应答中发挥作用（Oura等，2005）。

ASFV与其他的大DNA病毒类似，能够影响并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-Ibañez等，1996；Takamatsu等，1999）。ASFV抑制佛波肉豆蔻酸诱导的促炎细胞因子如TNF- α 、IFN- α 和IL-8的表达，同时诱导感染巨噬细胞产生TGF- β （Powell等，1996）。相反，有研究表明无论在体内还是体外，ASFV感染后TNF- α 上调表达，提示TNF- α 可能在ASFV的致病机制中起关键作用，因为TNF- α 会对血管通透性、血液凝固以及诱导未感染淋巴细胞凋亡等方面进行调节（Gomez del Moral等，1999；Salguero等，2002 and 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）是一个具有锚蛋白重复序列的蛋白，它是目前已知的唯一一个与细胞IkB蛋白具有同源性的病毒蛋白。IkB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。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，特别是考虑到NF κ B转录途径在诱导多种促炎因子，抗病毒介质以及细胞因子的表达发挥重要作用（Miskin等，1998；Powell等，1996）

。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（Granja等，2004b）。类似地，pA238L可能通过参与p300反式激活机制来抑制iNOS的表达，并最终抑制一氧化氮的产生。有趣的是，从致病性ASFV中缺失A238L不影响体外巨噬细胞中的病毒增殖，也不影响家猪的病毒发病机制和毒力（Neilan等，1997b）。此外，ASFV编码的其他一些蛋白也参与调节或干扰宿主免疫应答。ASFV 8DR蛋白（pEP402R）是目前唯一的一个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（Borca等，1994b；Rodriguez等，1993a）。从ASFV基因组中敲除8DR基因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在体外可以抑制细胞免疫应答（Borca等，1998）。原位杂交比较试验表明，CD2受体的病毒同源物的缺失完全废止了ASFV在胸腺内的复制（Borca等，1998）。ASFV pEP153R（8CR）蛋白与细胞源性蛋白以及痘病毒中的蛋白类似，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）。然而，pEP153R在免疫调节中的潜在作用可能是微妙的，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；Vilanova等，1999）。ASFV多基因家族360和530在调节宿主主动免疫中发挥一定作用。与野生型病毒不同，感染Pr4 Δ 35（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 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不能检测到IFN- α ，但Pr4 Δ 35感染组巨噬细胞24小时后IFN- α 水平显著升高，表明MGF360/530直接或间接抑制I型干扰素应答。这种效应可以解释为什么Pr4 Δ 35在猪巨噬细胞中表现出生长抑制并且其毒力在猪体内衰减的现象（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方面的重要性。最初 Neilan 等（2002 年）开展的研究表明，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项目组证实，这些基因的缺失与猪感染试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）。

猪体内 ASFV 蛋白的免疫原性研究也取得了重要进展。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应答。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应答的能力（Argilaguet 等，2012；Argilaguet 等，2013；Lacasta 等，2014；Jancovich 等，2018）。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，说明还需进一步开展工作，以发掘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 蛋白的免疫原性特点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，为亚单位疫苗的研发迈出了第一步。

差距

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。中等毒力或实验室致弱的 ASFV 突变株感染在猪群体内会产生同源保护性免疫。这些免疫动物对同源强毒的攻击能产生长期保护，但对异源病毒的攻击抵抗力很小。体液免疫和细胞免疫已被证明是 ASF 保护性免疫应答的重要组成部分。尽管 ASFV 的中和抗体是针对特定病毒蛋白的，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，体液免疫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具体免疫机制仍不清楚。此外，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，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，对 ASFV 基因功能的鉴定和理解亦取得了一些进展，包括基因调节宿主免疫应答和在自然宿主感染过程中的直接作用。此外，在天然宿主上，很多之前没有被证实的病毒免疫原性蛋白的研究获得重要进展。几个主要的差距（待解决的关键问题）还包括：

- 1) 揭示介导猪只抗感染的免疫机制仍然是需要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) 弄清在猪体内病毒在感染过程中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 试验性疫苗诱导的保护机制方面存在较大的空白。目前有报道在 ASFV 基因组上单基因或双基因缺失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特定作用的了解。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（或试验疫苗）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 或试验性疫苗的细胞免疫应答在很大程度上是未知的，部分原因是对于猪体免疫学知识的缺乏。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 的中和表位或 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过程中的作用，因为产生的抗体有可能不参与疫病过程中的中和作用，却可能抑制病毒的传播。另外，疾病的抗体介导免疫增强也有可能发生，因为巨噬细胞摄入病毒可能由抗体 Fc 受体介导完成。了解 ASFV 诱导产生的抗体和 ASFV 介导的免疫应答作用可以让我们明白不同 ASFV 毒株之间毒力的差异，亦可以解释为什么一些野生非洲猪虽然感染了 ASFV，但临床上并没有任何 ASF 症状。了解这些保护机制将有助于生产更安全的疫苗，包括研制亚单位疫苗。

异源毒株间保护力的相关性

异源毒株间交叉保护作用在很大程度上是未知的，部分原因是由于缺乏 ASFV 不同毒株可用的基因组序列，ASFV 的变异尚不清楚。很大程度上，对非洲（特别是在当前疫病流行区域）的野毒研究很少。在莫桑比克，血清学阳性猪至少可以抵抗两种以上高毒力毒株感染，例如基因 II 型和基因 VIII 型病毒，它们两个亲缘关系较远，但是仍有交叉保护作用，表明在野外条件下有交叉保护事件的发生（Penrith 等，2004）。可能从事交叉保护研究的国家包括乌干达、坦桑尼亚、莫桑比克和肯尼亚。在这些国家，允许使用地方性流行毒株作为候选株，使开展涉及大量动物的长期疫苗研究成为可能。

揭示交叉保护机制将有利于生产具有更好交叉保护作用的下一代疫苗，并有利于预知新型 ASFV 毒株暴发时该使用何种疫苗。了解参与交叉保护的特定病毒蛋白，将涉及对当前流行 ASFV 毒株进行测序以及对不同毒株进行大量交叉保护研究。

研究需求

- 1) 探究介导同源和异源毒株抗感染保护的免疫机制。
- 2) 弄清同源保护和异源保护相关的病毒遗传模式。
- 3) 鉴定参与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或毒力上的具体作用。
- 5) 探索基于细胞免疫的 ASFV 早期监测方法。
- 6) 揭示多基因家族在抗原变异性和免疫逃逸中作用。
- 7) 发掘与宿主应答保护相关的基因。

第四节 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 总结了在 2012-2018 年间，同行评审的科学出版物中报道的在试验条件下研究的 ASF 疫苗。组织传代培养致弱株或敲除了毒力基因的致弱株或低毒力的野毒

分离株可以使试验猪得到同源保护（Lewis 等，2000；Leitao 等，2001；Boinas 等，2004）。通常这些动物对同源病毒攻击可以产生长期的抵抗，但却很少能抵抗异源毒株的攻击（Hamdy and 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。

CD8+T 细胞缺失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）。被动接种来自免疫猪的抗体可以提供部分攻毒保护，提示抗体在免疫保护中有一定作用（Onisk 等，1994）。试验中使用 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）。但当使用强毒力的 ASFV 分离株攻毒时，有些结果无法重复（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 活病毒作为疫苗才能实现完全保护。

使用基因工程缺失特定毒力/宿主相关基因的减毒活病毒免疫猪群（Dixon 等，2008 and Tulman 等，2009），能在同源病毒攻击时产生保护作用（Lewis 等，2000；Moore 等，1998；Zsak 等，1996 and 1998）。这项主要针对传统毒株进行改造的前期工作，最近已经扩展到当前新的流行株上。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）中敲除先前在 Malawi 分离株中发现的 9GL 基因会导致病毒减弱（Lewis 等，2000），证明它可以作为一种能抵抗同源攻击的试验苗。其他遗传操作包括在 Georgia 2007 分离株（O'Donnell 等，2015b）或 Benin 株中敲除一组 MGF 基因（Sanchez-Cordon 等，2018；Reis 等，2016），或此前没有定性的 DP148R 基因（Reis 等，2017），都能减弱亲本株的毒力并且能保护同源强毒株的攻击。

有意义的是，已首次实现了在同一个 Georgia 2007 分离株中敲除多个基因的复杂遗传操作。一开始有些试验是不成功的，毒株毒力明显减弱但不能诱导保护性免疫应答（O'Donnell 等，2016a；Abrams 等，2013）。相反，另一些试验中基因缺失可以有效提高疫苗的安全性和免疫原性，例如 9GL 和 UK 基因双缺失的 Georgia 2007 突变株，其疫苗的安全性和免疫原性显著提高（O'Donnell 等，2016b）。

使用 ASFV 疫苗需要关注的一个问题是在同一地区内流行的毒株存在潜在

的遗传多样性。虽然有传言表明不同基因型的病毒之间存在交叉保护，但直到最近才有试验证明这一点。从 Badajoz71 分离株中敲除 CD2 样基因会得到减毒株，它能诱导对同源亲本毒株的保护，也能诱导对异源 Spain75 和 Armenia2010 分离株的保护作用 (Monteagudo 等, 2017)。这一特殊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。

由于缺乏对病毒免疫保护的抗原的研究，基于表达保护性抗原来研究亚单位疫苗的方法没有取得显著进展。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。在这一方面，有一些报道研究了利用多种表达载体分别单独表达 ASFV 抗原引发的细胞和抗体应答。如，依据不同标准选择的几种不同的病毒蛋白已经通过使用牛痘载体 (Lopera-Madrid 等, 2017)、DNA 载体 (Argilaguët 等, 2012; Argilaguët 等, 2013; Lacasta 等, 2014)、腺病毒载体 (Lokhandwala 等, 2016; Lokhandwala 等, 2017) 或其组合的方式用于猪的免疫 (Jancovich 等, 2018)。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。有涉及攻毒保护率未达到 50% 以上报道 (Argilaguët 等, 2012; Argilaguët 等, 2013; Lacasta 等, 2014; Jancovich 等, 2018)。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，使用牛痘载体和腺病毒载体表达 8 种未公开的特异性病毒蛋白对猪进行连续免疫，可以对强毒力的 Benin 分离株产生 100% 的免疫保护 (Netherton 等, 2018)。这是迄今为止唯一表现出有完全保护效力的 ASFV 亚单位疫苗的报告。

差距

虽然减毒活疫苗是目前最有希望的，但其中一个主要问题就是安全性。所谓

安全的疫苗取决于它的使用区域；例如，选择一个与在流行地区流行的 ASFV 毒株具有相同骨架的疫苗，在疫情爆发期间使用与在未感染区域使用，结果是截然不同的。目前还没有能区别免疫动物和感染动物的标记疫苗（DIVA）问世。

目前还没有有效的细胞系能够用于疫苗生产，这导致了 ASFV 疫苗研究的另一个显著空白。没有可用的细胞系，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的细胞是猪的原代巨噬细胞，但这难以用于疫苗的商业化大规模生产。

研发安全有效的 ASF 疫苗，特别是以控制和根除为目的而设计的疫苗，存在的一些关键空白包括：

- 1) ASFV 毒力决定因素还未得到全面鉴定，这限制了减毒疫苗株的开发。
- 2) 缺少适用于 ASFV 疫苗生产的稳定细胞系。
- 3) 尚不明确用于设计诱导保护性免疫应答亚单位疫苗的 ASFV 基因。
- 4) 免疫保护性机制尚不清楚。
- 5) 不同 ASFV 毒株之间的抗原变异性及其对异源毒株的疫苗交叉保护作用的影响尚不清楚。
- 6) 尚未找到合适的抗原标志，用于开发负选择标志疫苗来区分感染动物和疫苗接种的动物。

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，包括 ASFV 基因组新型毒力决定因子，免疫所需的抗原靶点和免疫逃避机制。
- 2) 确定试验减毒活疫苗的安全性。
- 3) 为疫苗生产开发稳定的细胞系，使 ASFV 能够大量生长并可用于商业化疫苗的生产。
- 4) 设计基因缺失的重组 ASFV 作为潜在的候选疫苗，包括添加 DIVA 标记。

第五节 诊断

多种实验室诊断技术可用于 ASF 病原和抗体检测，两者结合是检测 ASFV

的推荐方案。需要指出的是，ASF 具备有利于检测的三个特点：i) 病毒血症通常从感染后 2-3 天开始，并持续数周；ii) 感染后 8-15 天，血液中便出现高水平的特异性抗体，并持续很长时间，有的甚至持续数年；iii) 由于没有可用的疫苗，特异性抗体（如果出现在动物死亡之前）是非常理想的感染标志。然而，用中等毒力 ASFV 分离株经口服和肌注途径，试验感染仔猪、青年猪和成年野猪，攻毒后 12 天内，均出现 ASF 急性临床症状并导致 100%死亡，血清中未检测到特异性抗体，也不能有效传染与其接触的家猪和野猪（Gabriel 等，2011；Blome 等，2012）。在试验条件下，无论接种剂量如何，在感染中等毒力 ASFV 分离株后，年龄较大猪的存活率似乎比小猪要高（Post 等，2017）。

由于感染猪体内长期持续存在抗 ASFV 特异性 IgG 抗体，这为检测亚急性和慢性 ASF 感染提供了主要策略，对 ASF 根除计划至关重要。有数种检测技术可用于 ASF 抗体检测，但最常用、最实用和最廉价的检测方法是酶联免疫吸附试验（ELISA），以及作为确诊方法的免疫印迹试验（IB）、间接免疫荧光抗体试验（IFA）和免疫过氧化物酶试验（IPT）。可采集用于 ASF 实验室诊断的样本类型有：可疑活猪的全血、扁桃体刮屑或拭子以及病死猪的淋巴结、肾脏、脾脏、肺、血液和血清。组织样品常用于病毒分离（HA 试验）、病毒抗原检测（DIF 试验）和病毒 DNA 检测（PCR 检测），而血液、扁桃体刮屑和扁桃体拭子仅用于病毒分离和病毒 DNA 检测。血清样品用于 IFA、ELISA 或 IB 方法检测抗体；组织渗出物可用于 PCR 方法检测病毒 DNA 以及上述血清学方法检测抗体。

最常用的 ASFV 检测和鉴定方法是红细胞吸附试验（HA）、直接免疫荧光试验（DIF）以及 2000 年以来兴起的 PCR 方法。虽然 HA 和 DIF 检测技术目前尚未商品化，但有多种定量 PCR（qPCRs）检测试剂盒已上市，并在欧洲多个国家获得许可（例如德国已经批准 5 个国际公司提供的 ASFV 检测试剂盒，另外有两种检测试剂盒正在审批中）。事实证明这些检测方法非常准确、特异和敏感。有一种 PCR 检测试剂盒，包含了所有的试剂，如冻干保存的试剂及其稀释缓冲液以及阳性对照（Zsak 等，2005）。内部阴阳性对照是保证检测可靠性的先决条件。

病毒检测技术

病毒检测与分离

红细胞吸附试验（HA）是ASFV最可靠的鉴定方法，具有高度的敏感性和特异性。HA是基于大多数ASFV分离株诱导的血液吸附特性，在猪红细胞存在情况下，感染病毒的猪巨噬细胞在出现细胞病变之前，其周围形成特征性的“玫瑰花环”。需要指出的是，已经观察到有少数野毒株只产生细胞病变，而不产生红细胞吸附现象，这些病毒株只能通过PCR和/或DIF试验对病毒感染的细胞培养物进行鉴定。

病毒 DNA 检测

2000年以来，多个实验室建立了检测ASFV核酸的普通PCR和实时荧光PCR检测方法，其中一些方法已经得到验证（OIE, 2000; Agüero等, 2003; King等, 2003; Zsak等, 2005）。这些方法大多针对ASFV P72基因高度保守序列设计引物，可确保检测出所有ASFV基因型，在ASF的流行病学监测和诊断中，这是一种优异的、相对快速的检测技术。也有基于病毒基因组其他基因的商品化试剂盒和内部检测方法得到充分验证。已在至少一个国家获准上市的商品化试剂盒有：INgene q PPA（Ingenasa）、virotype ASFV（Indikal Bioscience）、ID Gene ASF Duplex（IDvet）和Real PCR ASFV（IDEXX）。这些试剂盒的比对试验已在欧盟参考实验室以及一些国家参考实验室完成，结果即将发布。

直接免疫荧光试验（DIF）

DIF是用荧光素标记的ASFV抗体，在组织印迹涂片或冰冻切片中检测病毒抗原的一种免疫学方法。DIF既快速（1小时）又经济，对急性ASF具有很高的灵敏度，但对于亚急性或慢性ASF，检测的灵敏度仅为40%。灵敏度的下降似乎与抗原-抗体复合物的形成有关，抗原-抗体复合物的形成阻碍了病毒抗原与荧光素标记抗体的反应。

此外，还有一种已经商品化的ELISA病毒抗原检测方法：Ag-ELISA。由于抗原抗体复合物的存在，DIF和Ag-ELISA这两种检测方法对慢性ASF病例样品表现出非常低的敏感性。因而，这些抗原检测技术仅推荐用于急性ASF病例的诊断，而不推荐用于ASF地方性流行区域慢性病例检测，或ASF病例的个体诊断。

其它诊断技术

近年来,很多诊断平台已被应用于ASF诊断,其中大多数是基于DNA检测的。DNA检测作为多重检测方法的一部分(Lung等,2018,Xiao等,2018,Erickson等,2018,Hu等,2015,Shi等,2016,Sastre等,2016)或单项检测方法,有便携式PCR系统(Liu等,2017)、用于抗原检测的侧向流免疫层析装置(Sastre等,2016),以及新型检测平台如生物传感器(Mujibi等,2018)、微滴式数字PCR(ddPCR)(Wu等,2018)、重组酶聚合酶扩增(RPA)(Wang等,2017)、聚合酶交联螺旋反应(PCLSR)(Wozniakowski等,2017)、交叉引物恒温扩增(CPA)(Fraczyk等,2016)等技术,其中一些诊断技术操作时间短至10分钟,而灵敏度和特异性与OIE推荐的ULP-PCR相当。

抗体检测技术

抗体 ELISA

抗体 ELISA 是进行大规模血清学研究最有用的方法。目前,至少有三个常规使用的商品化 ELISA 试剂盒(分别来自 Ingenasa, Svanova 和 IDVet)。最近,另一种竞争性 ELISA 方法(IDVet,基于 p32 蛋白)通过了验证,结果可靠。还有一些内部使用的或正在开发和验证过程中的 ELISA 方法,都各有优缺点,在检测可疑或质量差的样品时应该加以考虑。这些 ELISA 方法检测 ASF 抗体,原理是 ASF 抗体与包被到固相载体的病毒蛋白结合,再与酶标记的 A 蛋白结合,这种酶与适当的底物反应时产生可见的颜色反应。一种商业化的抗体 ELISA 检测试剂盒(INgezim PPA Compact Ingenasa)已上市销售,且通过了西班牙中央参考实验室(CRL)的验证。“内部使用”的 OIE ELISA 程序以及用于 OIE ELISA 试验所需的标准化/通过验证的可溶性抗原,需预先提出需求申请,可由 CRL 提供。

免疫印迹试验 (IB)

IB 是一种高度特异、敏感且易于解释的技术,可以替代 IFA,作为 ELISA 阳性或可疑结果确认试验的推荐方法。因为 IB 没有可用的商品化试剂盒,所以标准化/可验证的 IB 抗原条应由自己的实验室制备。预先提出需求,CRL 也可以提供。但 IB 抗原条生产复杂,年供应量有限。

间接免疫荧光抗体试验 (IFA)

IFA 试验是一种快速检测技术，具有高灵敏度和特异性，可用于 ASF 血清或组织渗出液中抗体的检测。该方法是在 ASF 抗体可与 ASFV 适应毒株感染的单层细胞（Vero、MS 细胞系）结合的基础上，用荧光素标记 A 蛋白检测抗原-抗体反应。

免疫过氧化物酶试验 (IPT)

IPT 是一种在经过固定的感染细胞上进行检测的免疫细胞化学技术，通过检测过氧化物酶反应确定抗体-抗原复合物的形成。在该过程中，先用 ASFV 细胞适应株感染 Vero 或 MS 细胞，再将经过固定的感染细胞用作抗原，检测血清样本中针对 ASF 的特异性抗体（Gallardo 等，2015）。

现场检测

最近，据 Cappai 等人（2017）报道，一种商业化的血清学现场检测技术在意大利撒丁岛进行了应用和验证，采用的技术是由 Ingenasa (INgezim PPA CROM) 生产的侧向流免疫层析装置 (LFD)。该研究检测了野外条件下捕猎到的野猪，方法的敏感性为 82%、特异性为 96%（在实验室条件下表现更好）。试验证实使用这种现场检测技术不仅更便宜、更省力，而且还可提供快速的检测结果。因此，这种试验方法在某些条件下可以考虑应用。

病毒学检测技术（推荐使用 PCR 测试，因为在慢性病例中，抗原检测技术如 DIF 和抗原 ELISA 敏感性非常有限）和血清学检测技术（ELISA，和阳性及可疑结果的确认试验 IPT / IFA 或 IB 方法）同时联合应用，可以在很短的时间内检测所有 ASF 流行病学情况（急性、亚急性和慢性），结果准确、可信。

ASFV 分离株特性，采用国际上建立的标准化规程，由欧盟区域实验室通过基因分型进行鉴定。基因分型策略涉及 ASFV 基因组上三个独立区域的测序：i) VP72 编码基因的 C 末端；ii) VP54 的全基因序列；iii) 在 ASFV 基因组内称为 CVR（中心可变区）的可变区域，该区域存在串联重复序列（TRS）。为确定引起 ASF 暴发疫情和病毒基因型之间的关系，以部分 VP72 和全长 VP54 的序列对 ASFV 分离株进行主要亚群归类分析，其结果优于 CVR。这种方法提供了有关欧洲、美洲和非洲 45 年来流行毒株的更多信息。此外，这些方法已被用于确定

最近几年在欧洲（意大利和高加索地区）和非洲引起多起疫情暴发的病毒的亲缘关系和起源。

ASF 诊断方法的最新研究进展

病原检测研究进展

最近的一项研究比较了已有的检测方法在东欧当前暴发境况下的检测效果（Gallardo 等，2015），研究发现通用探针库（UPL）PCR（Fernandez-Pinero 等，2013；Gallardo 等，2015）是最敏感的检测方法，其次是 OIE 规定的实时定量 PCR（King 等，2003）和常规 PCR。总的来说，这些方法之间的符合率良好（UPL 和实时 PCR 之间为 94%；UPL 和常规 PCR 之间为 88%）。商品化 ELISA 抗原检测试剂盒（INgezim PPA DAS K2；Ingenasa）的灵敏度约为 77%。

等温扩增方法有助于在普通实验室、甚至在田间采样现场做出诊断，最近几年这些方法得到了研究关注。交叉引物恒温扩增技术（靶向 p72 基因）是一种已经试用于 ASFV 检测的等温扩增方法，Fraczyk 等（2016）证明至少在所设定条件下该方法与 UPL PCR 一样敏感。针对拓扑异构酶 II 基因的环介导等温扩增（LAMP）方法也得到了相似的结果。除了常规装置之外，使用生物素和荧光素双标记的扩增子，在侧向流免疫层析装置上可以实现检测结果的可视化（James 等，2010）。除 RPA 等其他等温方法外，过去几年，还对野外适用型 PCR 仪作了研发测试。但是，这些方法还需要进一步评估。

抗体检测的研究进展

关于 ASF 抗体检测，最近比较了五种血清学方法，包括三种商品化 ELISA（来自 Ingenasa，IDVet 和 Boehringer Ingelheim Svanova 三个公司），OIE-ELISA 和待验证的免疫过氧化物酶试验（IPT）。IPT 被证明是最敏感的方法，可以用于测试组织分泌物（Gallardo 等，2015）。当只有很少的抗体产生时，IPT 就能够在血清学应答的早期检测到 ASF 抗体。

总的来说，目前已经发现了合适的抗原并且成功表达用于 ASF 的血清学检测，对相关信息也已进行过归纳总结。对已有数据的评估还发现了这些检测方法在通用性方面所具有的优缺点（Perez-Filgueira 等，2006；Cubillos 等，2013）。在非洲地区，已经证明应用 Morara/Georgia 毒株的重组 p30 抗原能够真实反映整

体流行情况。这些数据已用于（参见 Svanovir ELISA 和 IDScreen）或将用于早期以及可靠的新型 ASF 抗体检测方法的开发。目前常用的商品化 ELISA 试剂盒至少有三种（来自 Ingenasa, Svanova 和 IDVet），其他方法正在研发和验证中。所有这些方法各有不同的优缺点，特别是用于低质量的野猪血清检测时。各实验室的检测结果有所不同。

现场检测方法、其它替代采样和检测方法的最新研究进展

除了针对 ASF 抗体检测的单重侧向流免疫层析装置（LFD）技术之外，已经报道了关于 ASF 和猪瘟（CSF）的多重 LFD 方法，这将有利于实现对这两种传染病的同时监测（INgezim ASFV-CSFV-CROMAb）（Sastre 等，2016a）。

在 Pulawy 召开的最新 ASF-STOP 会议上，有研究数据表明侧向流免疫层析装置也可以用于血液拭子样品检测（Carlson 等人，已投稿）。

LFD 技术用于病毒抗原检测的研究已经公开发表（INgezim ASFV-CROM）（Sastre 等，2016b）。该方法的灵敏度与抗原 ELISA 相当，通常可检测到 $> 10^4$ HAU 的病毒载量。因此，（大多数情况下）病畜或 ASF 致死动物应为阳性。与其他检测方法结合使用，该技术提供了一种可用于偏远地区或者其它问题地区（比如无法运输野猪尸体）的快速检测方法，尽管其灵敏度非常有限。

非侵入性采样策略改善了对野生动物进行监测的手段，该方法规避了费时费力的狩猎/捕获采样方法的必要性，后者甚至可以导致病毒进一步扩散的后果。最近，对不同活体采样方法的使用效果进行了实验室和田间评估。

其中一种非侵入性采样方法是收集野猪栖息地的粪便。在这方面，de Carvalho Ferreira 等人（2014）评价了粪便样品的适用性。他们证明，与检测血液中的病毒相比，病毒可以在粪便中检测到的几率为 50-80%。在亚急性/慢性感染期，检测到的几率降至 10% 以下。尽管在不同感染阶段该方法的检出率差异很大，但同时发现 ASFV 的 DNA 在粪便中相当稳定（在 12°C 下半衰期超过两年或在 30°C 时约为 15 天）。因此，检测粪便可以作为监测方法的有益补充。除检测基因组外，最近还发现粪便也适用于 ASFV 特异性抗体检测（Nieto-Peigrín 等，2015）。

另一种方法是使用（诱饵）绳索来收集口腔液。口腔液已被证明适用于抗体检测（Mur 等，2013；Giménez-Lirola 等，2016）和基因组检测（Grau 等，2015）。

关于诱饵绳，已发表的研究主要包括 CSF (Mouchantat 等, 2014; Dietze 等, 2017) 和 FMD (Mouchantat 等, 2014)。在田间和实验室都用类似的方法进行过 ASF 的研究。在俄罗斯，绳索被留在饲喂场地，并且证据表明绳索被野猪咀嚼过。

在坦桑尼亚，Braae 等 (2013) 研究了使用 FTA 卡进行血液采集和在田间条件下进行后续 qPCR 检测。在一组临床健康动物中检测到了病毒 DNA，并且在实验室条件下核实了该方法。

这些结果与 Randriamparany 等 (2016) 和 Michaud 等 (2007) 报道的结果一致。从长期保存 (实验室及田间条件下) 的干燥血液滤纸中成功实现了 ASFV 诊断 (和分子特征分析)。特别是在热带环境中，无需冷链和苛刻的运输条件，这些方法确保了下游应用的适用性和稳定性。此外，Randriamparany 等 (2016) 还证明了这种方法对抗体检测的适用性。具体来讲，该研究表明用于滤纸样品的实时 UPL PCR 与病毒分离和常规 PCR 等常规检测方法一样敏感，并且 ELISA 用于滤纸样品与用于血清样品的效果相当。在特异性方面也未遇到问题。

与上述 FTA 卡和滤纸一样，Petrov 等 (2014) 证明，干血拭子 (通常使用各种棉、泡沫或棉纸拭子) 是一种的实用、稳定且易于操作的方法，用于从尸体采样检测 ASFV (和 CSFV) 基因组。该方法的优点是拭子已经与便于装运的容器一体化组合，避免了与样品的进一步直接接触，也无需其他的设备。在这项研究中，被称之为 Genotubes 的管子 (Thermofisher) 在操作简便性和稳定性方面表现最佳。在随后的概念验证研究中，证明了这些拭子也适用于 ELISA 方法 (原本用于滤纸片的试验方法) 检测 ASFV 抗体 (Blome 等, 2014)。

最近，这些初始数据得到了更广泛的验证和补充，其中也包括与抗体侧向流免疫层析装置的结合使用 (Carlson 等, 已投稿)。上述验证实验获得了用 Genotube 样品缓冲液时的检测数据 (与常规样品缓冲液和检测方法相比): qPCR 具有 98.8% [CI 93.4, 100.0] 灵敏度和 98.1% [CI 90.1, 100.0] (在实验室条件下)、85.7% [CI 71.5, 99.6] (储存的田间样品) 特异性，同时，血清学 ELISA 检测具有 93.1% 的灵敏度 [CI 83.3, 98.1] 和 100% 的特异性 [CI 95.9, 100.0]。与使用 Ingenasa 的抗体侧向流免疫层析装置 (LFD) 的检测结果符合率良好。这个方法用于质量差的样品时也几乎不会遇到问题，这特别有意义。

Ballester 等（2015）已经描述了一种利用地高辛标记的探针，在福尔马林固定的石蜡包埋组织中检测非洲猪瘟病毒（ASFV）DNA 的优化原位杂交方案，这个方案可用于研究病原发病机制和机体免疫应答（疫苗接种/攻毒试验中免疫保护作用 and 病毒分布的相关性），也可用于尸检诊断。

基因分型

为了更好地了解引起最近疫情的病毒分子流行病学，更多的基因标记正在研究中，其中有的位于不同的基因间隔区。

可以利用目标序列捕获技术进行靶基因富集，促进下一代测序技术应用（Fernández Pinero, 未发表）。

结论

最后，在过去几年里诊断测试方法取得了长足的进步，但是仍然需要协调一致、适应具体情况的诊断工作流程，以及帮助我们进一步改善诊断方法的病原生物学知识；下一代测序方法还需要优化和协调工作流程。值得注意的是，过去几年诊断领域已经扩展到探索新型样本的检测技术。不仅是改进现有技术用于检测新型样本，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 等，2014）和口腔液（Mur 等，2013；Grau 等，2015；Gimenez-Lirola 等，2016），而且也在探索用于其他类型样本的检测方法，如空气（de Carvalho Ferreira 等，2013）和饲料（Dee 等，2018）。这些技术扩展将有助于达到更环保和更少侵入性的诊断要求。

差距

我们通常根据临床症状来怀疑 ASF，但临床症状通常是非特异性的，难以与其他猪病区分，包括经典猪瘟、猪丹毒、沙门氏菌病、猪附红细胞体病、巴氏杆菌病、伪狂犬病、血小板减少性紫癜、华法令（杀鼠灵）中毒和重金属中毒。流行国家的地区实验室缺乏提供可靠诊断服务的基础设施和/或专业知识。非洲现有的一些地区实验室能力有限，大多数实验室使用荧光试验，而不是实时 RT-PCR。

诊断的主要差距是：

- 1) 缺乏大规模、可确诊的商品化试剂盒。
- 2) 需要在不同流行情况下（如 ASFV 弱毒株或强毒株），对血清学以及病毒学检测方法的适用性进行验证
- 3) 需要对当前 ASF 毒株进行生物学鉴定，确定血清型和致病性，为建立判定 ASF 毒株血清型和致病性的实验室体外检测方法提供依据。
- 4) 为了替代费时费力的、均一的原代细胞培养物进行病毒分离，需找到新的适应于 ASFV 复制的细胞
- 5) 在开发诊断方法时，必须考虑全球 ASF 流行情况。但某些情况下，可以因地制宜的采用特定方法。
- 6) 对于采用血清学方法进行疫病的早期诊断，应改进 ELISA 体系，包括可能使用替代样品基质。
- 7) 为了了解其遗传多样性，需要对非洲森林中栖息的循环宿主开展研究。
- 8) 需要对现场测试和其他可用于田间诊断的检测技术进一步开展深入研究。
- 9) 迫切需要从临床和 ASF 诊断的角度加强对耐过猪的研究。
- 10) 应寻找与致病性相关的新遗传标记。
- 11) 考虑到适用性和总体流行情况，需要对新的检测方法进行田间验证。
- 12) 有必要加强培训和后续工作，以便在国际上协调诊断测试。

研究需求

- 1) 为改进病毒分离技术，鉴定/开发细胞系来替代原代细胞。
- 2) 全面验证新的或改良的 ELISA 方法，检测替代样本（如血液、组织渗出液、口腔液、肉汁、滤纸等）中的抗体。
- 3) 改进商品化诊断试剂盒（分子病毒学和血清学检测）试剂稳定性，以便于运输和延长保质期。可以通过探索不同的方法来实现，如凝胶化冻干等。
- 4) 病毒基因组测序的自动化和标准化，用于 ASFV 毒株分型。
- 5) 考虑到世界各地的不同情况，有必要在更大范围内对新检测方法进行田间验证。
- 6) 野猪无创采样方法的开发与评价。
- 7) 验证现有的现场诊断工具，在非洲野生动物中加强检测和改进监测。

- 8) 商业化、可确诊的血清学检测技术的开发、评估和田间验证。
- 9) 被咬动物体内抗蜱虫唾液抗原的抗体 ELISA 检测方法, 有待标准化和验证。
- 10) 利用适当的血清学和病毒学诊断试验来鉴定/检测耐过猪, 提高对耐过猪作为潜在散毒者的认识。
- 11) 研究弱毒株与持续性感染的效应及检测方法。

第六节 流行病学

1909 年非洲肯尼亚的家猪首先爆发非洲猪瘟, 后传入欧洲。当时它是一种急性、出血性疾病, 可导致家猪 100%死亡率 (Montgomery 等, 1921)。随后认为 ASF 一直存在于南部非洲和东部非洲的野猪中 (Penrith 等, 2013)。ASF 在非洲仍然呈地方性流行, 每年持续暴发大量疫情 (见表 1)。新感染的非洲国家迅速成为地方性流行国家, 如中非共和国、乍得、埃塞俄比亚和大量的西部非洲国家 (Achenbach 等, 2016; Brown 等, 2018)。

1957 年, ASF 首次传播到非洲以外的国家葡萄牙, 原因是使用了航班废弃物饲喂里斯本机场附近的猪 (Costard 等, 2009; Gallardo 等, 2015)。1978 年, ASFV 以相似方式传播到巴西 (Lyra 2006)。除了意大利的撒丁岛, 非洲以外所有传入国家的 ASF 都被成功根除。然而, 2007 年 6 月, 格鲁吉亚共和国向 OIE 通报了高加索地区爆发的一起 ASF, 很可能是由非洲船舶带入的污染了 ASFV 的猪肉饲喂猪导致 (Rowlands 等, 2008)。从此, 16 个国家包括俄罗斯、东欧、波罗的海国家 (Wozniakowski 等, 2016; Nurmoja 等, 2017)、保加利亚、罗马尼亚、匈牙利、捷克、波兰、比利时爆发了新的 ASF 疫情。2018 年 8 月, 中国首次报道了 ASF 疫情 (见表 1)。

在不同的感染国家、地区和大陆, ASF 的流行病学可能有很大不同。主要根据 ASF 在不同猪群中的病毒传播方式, 家猪循环和森林野猪循环两种类型的传播循环被确定 (Costard 等, 2009)。感染地区有/无节肢动物媒介 (如蜱) 将影响病毒在环境中的传播和存在 (Plowright 等, 1994)。在非洲撒哈拉以南地区, ASFV 存在一个疣猪和软蜱之间的森林传播循环。在非洲地方性流行地区, 家猪

爆发疫病的传染源为感染病毒的蜚和疣猪。一旦建立感染，病毒便可在家猪之间有效接触传播（for review: Tulman 等，2009）。家猪和疣猪之间尚未发现直接接触感染（Costard 等，2009）。因此，ASF 可能表现出独特的区域存在模式，并且与一系列独特的风险因素相关联，我们要对这些风险因素进行评估，并建立恰当的监测和控制措施。

将从撒哈拉以南非洲国家分离的毒株分为 24 个不同 *p72* 基因型。然而，使用 *p72* 基因分型只能提供毒株最初特性，不能直接提供不同基因型之间交叉免疫或毒力的资料。非洲大陆以外，只检测到属于西非 *p72* 基因 I 型的毒株。然而，2007 年格鲁吉亚及后来高加索地区所有爆发的 ASF 属于一个与 *p72* 基因 II 型有关的新毒株，它自 1989 年以来一直在非洲东南部流行。从此，ASF 蔓延到邻国亚美尼亚、阿塞拜疆和俄罗斯联邦，一路进入欧洲中部和西部，最近传入世界上最大的养猪国中国。2018 年 ASF 在亚洲的爆发证实了其蔓延到非洲大陆以外国家的威胁很大，可能对全球养猪业带来灾难。

尽管 ASF 基因型在病毒生物学上的重要性不很清楚，但它有助于我们了解 ASFV 的分布与进化。继续对地方性流行地区的 ASF 毒株评估很重要，近来在莫桑比克（Quembo 等，2017）和埃塞俄比亚（Achenbach 等，2017）报道鉴定出新的基因型就是证明。

根据目前获得的资料，ASFV 类型在全球分布可能描述如下：

- 西部非洲（基因 I 型）
- 东部和中部非洲（所有已知基因型）
- 撒丁岛（基因 I 型）
- 高加索地区、俄罗斯、欧洲（基因 II 型）
- 中国（基因 II 型）

差距

需要继续了解尤其与野猪和蜚有关的 ASFV 毒株的分子流行病学信息。在地方性流行地区像撒哈拉以南的非洲地区，基于基因分型的 PCR 可能是一个工具；然而，倘若在新发地区，最重要的任务是完成病毒基因组测序，这将提供病毒潜在来源和可能与其他毒株同源性的必要信息。

研究需求

- 1) 继续进行分子流行病学研究以监控捕获的和野生的猪群及软蜱分布，这对有效解决地方性流行地区的 ASFV 问题必不可少。这些研究对于预防和监测也是十分重要的。
- 2) 开发 ELISA 用以检测蜱。
- 3) 需要加强非洲森林型循环宿主的病毒检测、分离和鉴定，用于基因分型。
- 4) 持续对当前非洲和欧洲流行毒株进行生物学和分子鉴定。
- 5) 鉴定和应用与病毒毒力有关的新的系统进化标记，以了解地方性流行地区的病毒进化。
- 6) 更好地了解疫病、猪和猪肉价值链的社会经济学，尤其是那些涉及到生物安全程度低的场所。
- 7) 更好地了解 ASF 在流行和地方性流行状况下的成本（直接和间接）。
- 8) 确定更好的管理措施来控制野猪发病。
- 9) 更好地了解环境污染和吸血昆虫在疾病传播中所起的作用。
- 10) 需要在个体、群体和区域（低 VS 高猪群密度）水平上对紧急控制方案中的 ASF 流行病学进行评估和建模。
- 11) 需要进行有关 ASFV 控制或蔓延的风险评估。

第七节 监测

ASF 在家猪的临床表现取决于流行毒株的毒力。家猪感染产生从高致死的急性症状到亚临床症状的几种类型，取决于病毒和宿主因素（Tulman 等，2009）。

不同于家猪，非洲野猪感染 ASFV 通常无症状、低毒血症（Heuschele and Coggins 1969; Montgomery 1921; Plowright 1981; Thomson 1985）。ASF 呈现的这些特性及其与其他猪病的临床症状相似性，妨碍了完全依靠临床症状的监测工作。鉴于 ASF 流行病学的复杂性和疫病临床表现的多样性，有必要开展基于诊断试验的监测。

值得一提的是，所有针对猪或野猪的非侵入性方法（无创方法）都不能有效检测病毒，因为它们不会排出病毒。如果他们会咀嚼绳索，有可能检测抗体。重

要的是，尽管很多检测结果都是阴性，洞穴蜱虫仍可以用于疣猪的监测，但在阴性结果被认可前必须要做大量的检测（Personal communication, Marie Louise Penrith）。

差距

1) 监测是能够通过早期检测和控制疾病暴发，从源头根除本病的最重要对策。然而，对 ASFV 感染产生的不同的临床表现需要不同的监测策略。对于急性感染，可基于临床症状进行监测；然而，对于 ASF 症状不明显的温和感染或慢性感染，必须基于诊断试验辅以临床症状进行监测。

2) 被动监测通常是许多国家仅有的经济可行的解决方案，但 ASF 与经典猪瘟和其他具有相似临床症状的常见猪传染病难以鉴别，因此存在许多缺点。

3) 主动监测代价高，由于基于抗体的试验存在不足和缺陷，目前必须依靠直接诊断试验如病毒分离和核酸检测。

4) 对于持续感染，由于没有出现可疑症状，进行有效监测存在困难且代价高。可依据群体水平上的死胎率或其他生殖参数监测。然而，在这一指标在经济可行性上可能无特定意义。在设计一个综合的 ASF 监测系统中，对这类感染的监测呈现为一个致命弱点。

研究需求

1) 在实验条件下评估目前可用于监测的 ELISA 和 PCR 的性能和整体精确度。

2) 开发和评估可同时检测抗原和抗体的新监测方法，如 ELISA。

3) 开发试验检测蜱体内的 ASFV。

4) 为验证疫情监测措施，需要在紧急控制措施实施和暴露猪群中感染猪的诊断试验应用方面进行流行病学调查。

第八节 野猪和野猪科动物

野猪和野猪科动物在 ASF 的传播和维持上可能扮有重要角色。需要进一步研究了解野猪作为 ASF 储存宿主的潜在作用。

第九节 蜚媒

急需确定感染区（ASF疫情发生地）的蜚是否能够成为生物媒介。关键研究包括确定ASFV新毒株是否能有效感染当地蜚、是否能变为持续性感染。需要进一步研究了解软蜚分布。

第三章 对策评估

假设

以下是GARA工作组为评估可能的对策所做的假设，以提升我们控制和根除ASF暴发的能力。

情形

最严重情形下评估的对策：在无ASF国家的高密度生猪饲养地区有意散布ASF病毒污染物。

目标猪群

按照优先次序对目标生猪生产环节进行对策评估：

1. 散养猪
2. 综合性商业化养猪场（产仔、保育和育肥）
3. 商业化仔猪场
4. 大型集约化养猪场
5. 高价值的商业化种猪群

暴发范围

该对策评估了同时发生的多起疫情包括在1个家庭养猪户、3个商业化仔猪场、1个商业化育肥场、1个后备母猪场和有证据表明被感染的野化猪。

疫苗管理

由于没有疫苗可用，因此唯一的控制策略是及早发现并淘汰感染动物，并严格控制猪的移动。

决策模型

差距分析工作组使用定量 Kemper-Trego（KT）决策模型评估现有疫苗和诊断试剂，包括实验阶段的产品。在 GARA 科学专题研讨之前提供了该模型的使用说明（见附录 I）。工作组修改了模型中的标准和权重，以便评估现有的对策以

及试验用的 ASF 疫苗和诊断试剂（见附录 II、III、IV 和 V）。

标准

各工作组为能采用恰当而有效的分析方法比较各种对策，选用了以下关键标准：

疫苗

- 效力
- 安全性
- 单一剂量
- 可扩展速度
- 存储
- 配送/供应
- 群体免疫
- DIVA 兼容性
- 休药期
- 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
- 直接检测（抗原/DNA），发生疫情时进行 DIVA
- 间接检测（抗体），常规监测和疫情发生后监测进行 DIVA
- 目标验证
- 可扩展速度
- 通量
- 现场检测
- 快速结果
- 确诊试验的需求
- 易于操作

- 存储/配送/供应
- 实施成本

权重

每个标准都经过加权，以便定量比较所选干预措施的影响。

产品简介

为确保一致且有意义的评估，为每个对策确定了所需的产品配置文件（即基准）：

理想的疫苗简介

1. 高效性：防止传播；对所有日龄猪有效，包括克服母源抗体；一年的免疫持续期
2. 对所有日龄猪都是安全的；活疫苗毒力不返毒
3. 只需一个剂量
4. 生产速度快、规模大，可快速交付产品，产量高
5. 有效期为24个月或更长
6. 生产商有有效的存储和配送能力
7. 快速启动保护，7天或更短
8. DIVA兼容：能有效、可靠地区分感染动物与免疫接种动物
9. 休药期短，以供食品消费
10. 商品成本，管理成本，储存成本

理想诊断试验简介

1. 检测ASF所有基因型
2. 用于控制和根除的直接检测
3. 用于疫情控制后的监测/检测亚临床病例的间接检测
4. 快速检测-早期发现
5. 特异性高于95%
6. 敏感性高于95%
7. 现场检测

8. DIVA兼容性
9. 现场验证
10. 易于操作/易于培训人员
11. 可扩展性
12. 合理的成本

赋值

每项干预措施的赋值反映了 ASF 工作组成员的集体最佳判断（见附录 II、III和IV）。

疫苗

GARA差距分析工作组指出，目前针对ASFV合适的疫苗研究仅限于全球少数几个研究小组。表 II 提供了同行评议的2012-2018年科学出版物中报告的ASF试验疫苗的摘要。迄今为止，最有希望的候选疫苗是经适当致弱的基因缺失重组活疫苗。以前的研究发现了一些毒力基因和免疫调节基因，如果敲除这些基因，则可获得一个强有力的候选疫苗株。使用活的致弱病毒作为疫苗是一个完善的体系，具有良好的保护特性，但迄今在一些试验疫苗中检测到的毒性返强证据令人担忧。使用重组技术插入适当的标记物用于开发DIVA疫苗，这种疫苗在暴发疫情时尤为关键。

目前还没有具有良好安全性和效力的适当致弱的候选分离株，但是在过去几年里，几个实验室已经取得了进展，并且有可能正在接近开发出安全有效的实验性候选疫苗。替代减毒活疫苗、除去病毒返强风险的方法是使用亚单位疫苗。这既能满足安全问题，又能保证良好的DIVA特性。虽然以前的数据表明这种策略不能有效地预防ASFV感染，但目前正在进行一些有希望的研究，以探讨使用这种策略生产ASF疫苗的可行性。总的来说，正在进行的疫苗研制进展和初步结果表明，第一代疫苗可能在不久的将来就会出现。

总结

虽然目前对ASF进行疫苗接种仍不是一个可选项，但在弱毒活疫苗的研究和生产方面已取得了进展。

试验疫苗的评估

GARA差距分析工作组讨论了不同试验疫苗的特点。下面是小组对每种疫苗的意见总结。

1) *ASFV重组基因缺失弱毒疫苗*: 通过敲除已被鉴定为毒力决定因子的特定基因来减毒。结果,生产的减毒病毒株在免疫接种后28天左右,可有效预防亲本病毒攻毒而不发病。工作组认识到该试验疫苗的有效性,包括一次剂量可诱导有效保护、诱导免疫的快速启动/持续时间、产品的安全性以及开发DIVA试验的分子基础。缺乏异源保护被认为是其主要缺陷,尽管最近用这些疫苗获得的一些结果显示,在基因型不同的分离株之间存在一定的交叉保护。

2) *不同疫苗载体表达的亚单位重组ASFV蛋白*: 使用含有ASFV基因的不同重组载体;例如牛痘、浣熊痘、安卡拉、猪痘和人腺病毒。安全性、快速启动免疫、开发DIVA试验的可能性和实施成本被认为是这些疫苗平台的优势。值得注意的是,到目前为止,除了最近一份显示初步数据的报告外,没有试验证据表明AFSV单基因或一组基因制备的亚单位疫苗能显著保护家猪免受同源病毒的攻击。因此,ASFV亚单位疫苗的开发将依赖于进一步的研究,以识别保护性抗原和能诱导抗感染保护的病毒结构。

3) *ASFV DNA疫苗*: 技术上也是亚单位疫苗,是将ASFV基因克隆到DNA结构中作为免疫原。在GARA Gap分析研讨会上专家们指出该疫苗的唯一优点是它的安全性以及可能开发DIVA兼容性诊断试验。跟上文(2)所分析的候选疫苗一样,迄今为止尚未成功找出能用于亚单位疫苗的候选ASFV基因。

基于这一评估,ASFCWG认为最有希望的试验疫苗是以合理减毒的ASFV毒株为基础制备的疫苗。然而,ASFCWG认识到,该候选疫苗平台在基础开发的几个方面需要大量的实验评估,包括早期免疫诱导、DIVA兼容试验的开发以及无毒性返强。

诊断

GARA差距分析工作组认为这一对策的有效性较高。ASF的早期发现对于最大限度减少疫病传播和降低经济影响具有重要意义。美国的ASF监测是通过被动和主动监测项目相结合来完成的。针对疫情暴发后恢复阶段的诊断设计也至关重要。

总结

- 如果发现疑似，应同时开展病毒和抗体检测。
- ASFV的抗体反应需要7-10天。动物能存活。
- 感染后2-3天（dpi）可以检测到ASF病毒。疫病抗体可以维持较长时间。
- 潜伏期通常为3-15天。强毒株会引起超急型或急性出血热，其特征是高热、食欲下降、皮肤和内脏出血，在3-10天内死亡，有时甚至死亡前看不到早期临床症状。

实验室和商业化诊断试验的评估（见附录III 和IV）

ASFCWG确定并评估了用于监测、确诊和复养的6种诊断试验。这些试验可在世界各地实验室中使用，其中一种试验已商业化。这些试验的价值可根据《ASF控制和根除所需要的诊断试验》进行评估（见决策模型，附录I）。

1) *病毒分离 (VI)*。猪巨噬细胞原代细胞培养物中的病毒分离是一种经典的感染性病毒检测技术。病毒感染是通过红细胞吸附试验或细胞病理学方法来检测的。ASFCWG强调了VI的特性，包括技术的特异性和敏感性，以及结果不需要进一步确认的事实。然而，该技术也存在一些缺点，因为该项测试需要几天的时间，很难规模化实施，不可能在高通量体系中采用该技术，且需要专业技术人员来检测。

2) *普通RT-PCR*。该项技术是使用特异性引物对p72保守区域进行扩增。该技术具有良好的特异性和敏感性，经证实有效，易于规模化实施，结果迅速。遗憾的是，结果需要验证性技术的证实，且需要专业技术人员检测操作。

3) *实时RT-PCR*。该检测具有良好特异性，结果快速有效，易于在高通量体系中实施，易于规模化应用。与常规PCR方法一样，结果需要得到验证性技术的证实，并需要专业技术人员来检测。

4) *荧光抗体检测 (FAT)*。该方法采用荧光标记的抗ASFV特异性抗体来检测感染动物组织中的病毒。该检测具有较高特异性，结果迅速可用，已经过验证，价格低廉，并提供确定的结果。该项检测的缺点是不能大量检测，并需要训练有素的操作员来完成。

5) *抗原ELISA*。该试验采用捕获ELISA方法，使用抗ASFV抗体在酶标板上

检测病毒。该方法特异性好，但敏感性差。这种技术易于规模化，并适用于高通量体系。此外，它易于操作，并能迅速获得结果。除了灵敏度低，该技术的另一个缺点是缺乏验证，成本昂贵，结果需要通过其他技术来确认。

6) *多重PCR检测*。多重常规PCR可同时鉴别检测ASFV和经典猪瘟病毒(CSFV) (Aguero等, 2004)。该方法具有较高灵敏度和特异性，并已通过现场和实验室临床病料验证。在临床怀疑有猪出血性疾病的情况下，以及在两种病毒可在任何时候同时传播的国家/地区，这种检测是有用的。

实验性诊断试验的评估

GARA差距分析工作组确认并讨论了一些正在考虑用于实验室或现场检测ASF的新技术。

1) *环介导等温扩增 (LAMP) 技术*: LAMP是在核酸扩增的基础上进行的，不需要PCR设备。它只需联合使用具有链置换活性的DNA聚合酶和针对DNA靶的六个区域的4-6个特别设计的引物 (Notomi等, 2000)。LAMP被描述为一种高度特异和敏感的工具，它甚至可用肉眼观察到扩增的产物。LAMP技术相对简单，作为一种快速的一线工具，可适用于区域实验室的一线检测、简单诊断情形，甚至可以应用于现场检测。最近已经开发了几种LAMP检测ASFV的方法，目前正在标准化和验证 (Hertjner and Allan, QUB, Belfast, UK)。

2) *利用商业化通用探针库 (UPL) 进行实时PCR检测*: UPL最近由Roche Applied Science 商业化，是短水解DNA探针的集合，最初设计用于基因表达分析，并作为通用检测体系提供。目前，UPL探针还被应用于病原检测，其主要优点是成本合理、交货时间短、使用方便。将特异性引物和合适的UPL探针联合应用，可以相对较低的成本通过实时PCR对ASFV进行特异和敏感的检测。在不同病毒基因组区域设计的两种UPL实时PCR检测方法，最近已经开发并标准化用于ASFV检测 (Fernandez-Pinero, Gallardo, and Arias, CISA-INIA, Valdeolmos, Spain)。对其诊断适用性的验证正在进行中。

3) *线性指数 (LATE) PCR*: LATE-PCR是一种高级的不对称PCR，能产生大量ssDNA分子，结合特定的低T_m探针进行检测。与目前使用的PCR化学方法相比，该方法具有增强的多路复用能力和较快的热循环等优点 (Sanchez等, 2004)。新近开发了一种用于ASFV检测的LATE-PCR方法 (Hakhverdyan, Stahl,

and Belak, SVA, Uppsala, Sweden; in cooperation with Ronish and Wangh, Brandeis University, USA)。LATE技术由史密斯检测公司独家授权,开发的ASF检测方法将适用于便携式PCR平台BioSeeq,为ASFV在广泛环境条件下的现场检测提供一个强大的、易于使用的诊断系统。

4) 侧向层流装置 (LFD) : 一种能够特异性检测血清标本中抗ASF抗体的一步免疫层析试纸条(现场检测)正在研制中。定性分析建立在直接免疫测定的基础上,检测试剂为纯化的ASFV蛋白共价包被的乳胶微粒。捕获试剂是一种吸附在硝基纤维素膜带上形成一条检测线的病毒蛋白。在检测线之上创建第二条线,通过固化抗对照蛋白抗体形成对照线。将血清样本应用于样本垫。样品中存在的抗特异性抗体专门与标记的微粒结合。抗体-蛋白结合复合物通过毛细管作用引起的流动迁移至硝化纤维素膜,与固定化病毒蛋白发生反应,形成一条可见的检测线。

消毒剂/灭活

2017年, Davies等人研究了ASFV在实验感染动物粪便和尿液中的存活能力。根据半衰期计算, ASFV在37℃条件下大约存活4天(尿液)或3天(粪便)仍具有传染性。1999年, Turner和William的一项研究结果表明,猪粪中的ASFV在40℃条件下须4小时灭活,在65℃条件下5分钟可灭活(见表4)。

消毒剂

使用有效的消毒剂清洗感染场所、卡车和污染物是防止新引入ASF的一项重要措施。然而,许多常见的消毒剂是无效的。应注意使用专门批准用于ASFV的消毒剂。许多灭活方法和消毒剂已被测试和报道用于包括动物粪便在内的各种材料。表IV列出了消毒剂、应用范围、有效浓度、作用时间和参考文献的完整清单。

化制

动物副产品的化制在欧洲受到严格监管,包括压力3bar和133℃条件下消毒至少20分钟。任何超过70℃20分钟(或60℃30分钟)的过程都能灭活ASFV;因此,化制过程会灭活ASFV。

沼气池

非洲猪瘟病毒也可以在正确操作下的沼气池中在数小时（嗜热）或数天（嗜温）内灭活。这个过程不仅有使病毒失活的温度效应，还包括pH值、代谢产物等。然而，必须记住的是，沼气池的设计一般不是严格的固液分离（与高安全性的实验室或现代炼制厂相比）。因此，为了实现安全灭活和防止再污染，需要采取额外措施（预热、工艺调整）。Andres Moss的博士论文（Moss A. 2001）中指出，推荐对动物源性材料的预热至少在70℃。但是，在现场条件下很难执行。

尸体深埋

深埋尸体和土壤中ASFV灭活的评估研究正在进行，但在发表本报告时尚未完成。对于土壤，森林中的pH值似乎是病毒存活的限制因素。本报告将在这些实验结果完成后更新。

杀螨剂

控制软蜱的杀螨剂可能没有效果，因为蜱虫生活在宿主之外，在地下钻洞和建筑物的缝隙中。最佳的控制ASF方法是将猪从被软蜱感染的场所移走。

药物

目前还没有获得许可的抗病毒药物治疗猪ASF。

一些出版物报道了具有强力抗ASFV活性的化合物（Quetglas等，2012；Hakobyan，2017；Barrado-Gil等，2017）。其中一些是FDA批准的药物，但也有活性天然产物（Fabregas等，1999；Galindo等，2011）。仍需对它们在ASF中的潜在用途或应用分析进行研究。从流行病学和经济学的角度来看，抗病毒药物可能是免疫或根除策略的有益补充。如经典猪瘟（CSF）是猪的另一种流行病，在猪密度高的地区，抗病毒药物与大规模扑杀和紧急疫苗接种等其他常见应对措施相结合，可以有效控制疫情（Backer等，2013）。一项可能的益处是降低了感染动物血液中病毒滴度和排毒的可能性，减少传播风险，直到进行扑杀成为可能。因此，抗病毒药物可能减少在感染猪场周围易感动物中的传播（隔离带策略）。这些化合物可作为抗病毒和疫苗接种联合策略的补充，以减少弱毒活疫苗的病毒留存时间；但对其潜在用途的评估仍然存在差距。一种经过测试的抗病毒药物，亲脂性他汀类药物，对ASFV表现出一定的活性（Quetglas等，2012），显示其

作为疫苗辅助的潜在用途（Xia等，2018）。需要进一步的研究来了解抗病毒药物的作用机制，这反过来可能为开发新的候选疫苗提供信息。

个人防护用品 (PPE)

ASF 不是人畜共患病。个人防护用品适用于防止参与根除工作的动物卫生官员在农场间传播病毒。

第四章 建议

研究

GARA 建议优先开展下列研究，以提高快速发现、控制和应对 ASF 疫情的能力，包括在流行地区逐步控制和根除 ASF。

病毒学

- 完成每一基因型，不同毒力病毒，以及仅在家猪、野猪和蜱体内复制的病毒的全基因测序。
- 建立已经被不同实验室的不同技术确认的参考序列库，以解决重复区域和其他测序困难区域的测序错误。
- 协调测序工作流程，验证不同富集技术和宿主专一性。
- 利用ASFV生物信息学资源建立一个全面的数据库，其中应包含大量分离毒株的全基因组序列，以取代目前意义不大的基于基因型的分类。

病毒致病机理

- 研究控制宿主间（包括家猪、野猪以及节肢动物宿主）感染传播的基本参数。
- 研究不同易感宿主中不同毒力ASFV分离株的致病机理。
- 确定宿主免疫相关基因的激活模式，特别是在感染早期。
- 将转录组学和蛋白质组学结合起来，鉴定涉及宿主范围、毒力和致病性的ASFV基因和遗传决定簇（多基因家族等基因组）。
- 持续研究不同基因型和不同ASFV毒株致病力决定因素。

免疫学

- 探究介导对病毒感染有效的同源和异源保护免疫机制。
- 鉴定同源/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。
- 鉴定与促炎细胞因子和抗体产生有关的调节基因，并评估它们在家

猪的病毒感染/毒力上的具体作用。

- 探索基于细胞免疫的疾病早期检测新方法。
- 探讨免疫-致病机理，包括T细胞应答和MHC递呈。
- 提高我们对多基因家族在抗原变异和免疫逃逸中作用的理解。
- 识别与鉴定与宿主保护相关基因。

流行病学

● 建立全球ASF监测系统，提供高质量、准确和实时的ASF风险信息，以弥补全球ASF状况关键信息的差距，并支持全球ASF控制和根除。

● 继续进行分子流行病学研究，监测圈养野猪和野生猪群以及软蜱分布，这对有效解决地方性流行地区的ASFV问题至关重要。这些研究对于预防和监测计划也非常重要。

● 对现有检测蜱虫ELISA方法进行田间验证。

● 需要加强非洲森林循环宿主中病毒的检测、分离和鉴定，以便进行基因分型。

● 继续对当前非洲和欧洲流行病毒的分离株进行生物学和分子学鉴定。

● 识别和应用与病毒毒力有关的新的系统进化标记，以了解流行地区的病毒进化规律。

● 深入了解疫病、生猪和猪肉价值链的社会经济学，特别是低生物安全水平相关的社会经济学。

● 更好地了解ASF在流行和地方性流行情况下的（直接和间接）损失。

● 确定控制野猪疾病的管理工具。

● 更好地了解环境污染和吸血昆虫在疾病传播中的作用。

● 提升对康复猪作为潜在排毒者作用的了解，使用合适的血清学和病毒学诊断试验对康复猪进行鉴定/检测。

监测

● 进一步评价现有ELISA和PCR方法在实验和田间条件下检测的性能和总体准确性。在实验条件下评价当前可用的ELISA和PCR试验的性能和总体准确性。

- 对ASFV毒株分型的病毒基因组测序工作进行自动化和标准化。
- 评估不同毒力ASFV毒株在感染接触动物实验中的传播率。
- 在应急控制计划实施情况下需要在个体猪、猪群以及区域统计水平上（低密度猪群与高密度猪群）对ASF的流行病学进行评估和建模。
- 需要对ASFV的控制或传播进行风险评估。

诊断

- 支持现场检测新技术的开发。
- 评估和验证“以适用为目的”的商品化现场检测方法，以适用于监测、应急和复养。
- 确定/开发取代原代培养的细胞系，以改进病毒分离技术。
- 充分验证新建立或改良的ELISA检测方法，检测替代样品中的抗体（如血液、渗出液棉签、口腔液、肉汁、滤纸等）。
- 提高商品化诊断试剂盒（分子病毒学和血清学试验）试剂的稳定性，以解决运输和过期等问题。这可以通过探索不同的策略来解决，如凝胶化冻干等。
- 考虑到世界各国的不同情况，需扩大对新检测方法的现场验证范围。
- 开发并评估野猪无创采样方法。
- 验证可用的现场诊断工具，以强化对非洲野生动物的检测和监测。
- 开发、评价以及现场验证商品化血清学诊断试验。
- 标准化并验证用于检测被咬动物体内钝缘蜱唾液抗原的抗体ELISA方法。
- 研究弱毒株和持续感染的检测方法和影响。

疫苗

- 进行ASFV病毒学和功能基因组学研究，为疫苗研发提供信息。
- 确定实验的减毒活疫苗的安全性。
- 鉴定可增殖ASFV的肺泡巨噬细胞基因，为研发疫苗生产所需细胞系提供信息。
- 进一步研究可能的ASFV基因缺失工程候选疫苗。

- 需要对候选疫苗进行实验室间比对。
- 协调攻毒试验和检测结果一致。
- 继续探索有效亚单位疫苗的可能性。
- 研发可能的抗原疫苗标记物，以区分感染动物与免疫动物(DIVA)。
- 研发投饲野猪有效口服疫苗的诱饵。
- 研发和验证活疫苗的有效非肠道接种途径。
- 概念验证测试新型ASF分子疫苗无针接种系统。

生物治疗药物

- 检测对ASFV感染发挥快速保护作用的Ad5-IFN在猪体内的分布和表达。

消毒剂

- 研发低成本的商品化消毒剂，用于灭活污染农场和其他易感环境表面的ASFV。
- 探索使用消毒剂，降低来自ASFV感染畜体的感染风险。

野化猪和野猪

- 开展研究进一步了解野化家猪和野猪作为ASFV储主的潜在作用。

蜱虫媒介

- 确定蜱在ASF新暴发地理区域内是否可以成为生物媒介。
- 确定ASFV新分离株是否能有效感染当地蜱虫，以及是否会造成持续感染。
- 需要进一步研究以了解软蜱的分布。

储备

本报告中讨论的许多对策需要规划、准备并整合到一个协调的疫病控制规划中。关键是为储备的兽医对策提供资金，以便在 ASF 暴发的应急反应计划中使用。GARA 建议投资于实施优先研究事项，以支持灾备计划，并确保有效使用对策来预防、控制和根除 ASF。

第五章 结论

非洲猪瘟是一种跨界动物疫病，目前威胁着全世界的养猪业。尽管 ASF 是一种非洲的疾病，但它已经在高加索、俄罗斯、欧洲植根，目前正威胁着亚洲。最近这种大范围传播最重要的原因很可能是动物的非法移动、贸易和污染产品。这威胁着其他从事生猪和生猪产品贸易的国家，包括欧洲、南美和北美。此外，ASF 在新的地理区域和独特生态环境中暴发的流行病学影响尚不清楚，这使控制措施复杂化。监测计划是抗击 ASF 的第一道防线。诊断试验可用且需要在诊断实验室进行整合。疫苗接种是一项关键控制措施，但目前还没有疫苗可用，这是控制 ASF 暴发可用的应对策略的一个主要差距。

图 1 非洲猪瘟病毒系统进化分析

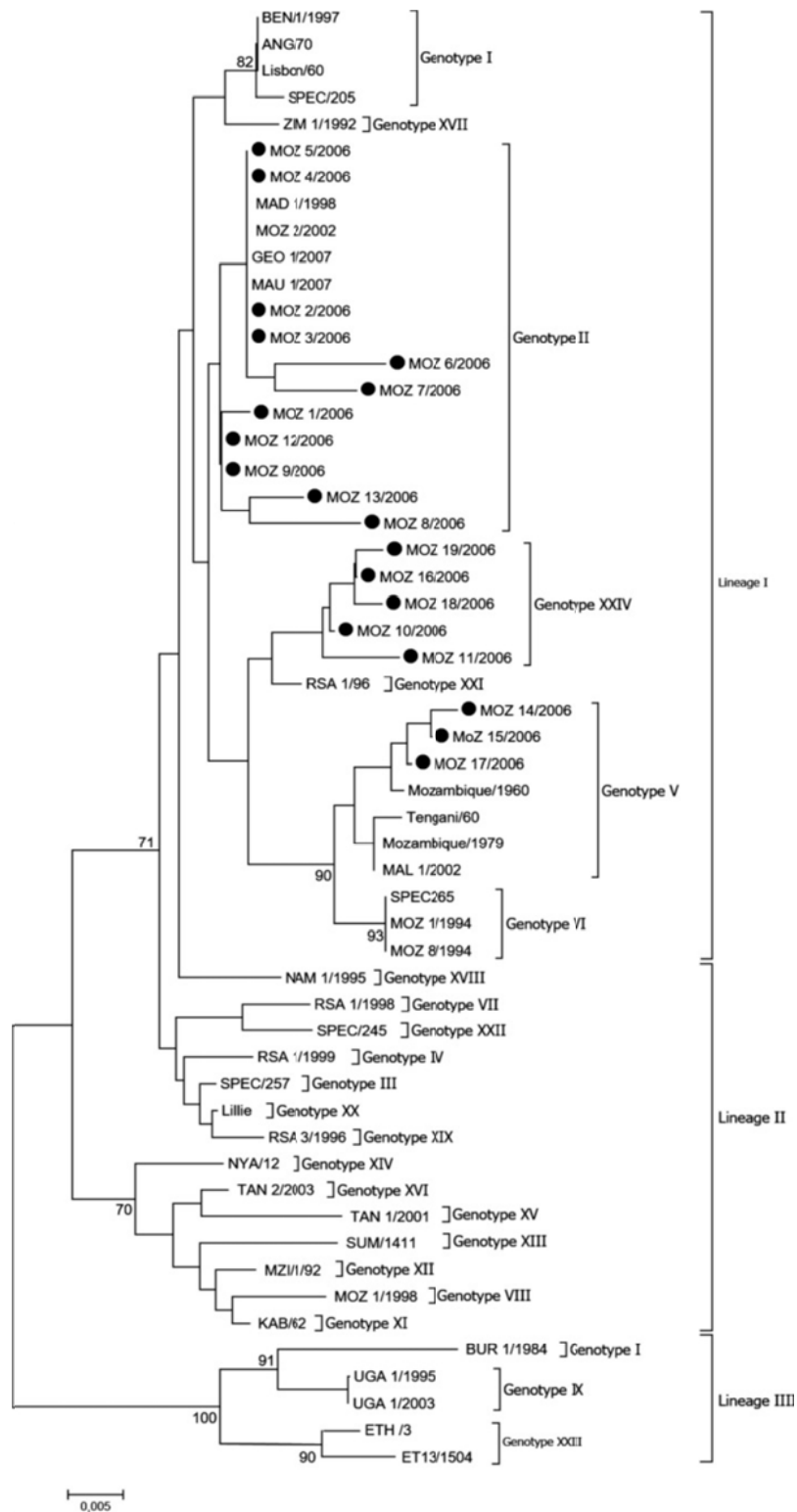


图 1 基于 p72 基因分型的 ASF 基因型系统进化树，揭示了 ASF 病毒的多样性 (Quembo CJ 等, 2018)

表 I : 2007-2018 年 ASF 疫情情况

国家	最近一次ASF疫情日期	参考文献/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
保加利亚	2018年	http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/
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
立陶宛	2018年	http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/
爱沙尼亚	2018年	http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/
捷克	2018年	http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/
意大利	2018年	http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/
南非	2018年5月	https://www.reuters.com
坦桑尼亚	2018年5月	www.xinhuanet.com
摩尔多瓦	2018年5月	https://www.moldpres.md/en/news/2018/05/12/18003882
波兰	2018年1月	https://www.pigprogress.net
乌干达	2018年	Charles Masembe personal communication
赞比亚	2018年	https://www.farmersweekly.co.za
肯尼亚	2018年	https://www.nation.co.ke › Business › Seeds of Gold
加纳	2018年	www.thepigsite.com
几内亚比绍	2018年	http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/statusdetail
布基纳法索	2018年5月	http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/statusdetail
尼日利亚	2018年2月	http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/statusdetail
爱沙尼亚	2017年12月	www.fao.org/fileadmin/user_upload/reu/europe/documents/.../ASF.../3_estonia.pdf
布隆迪	2017年12月	http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/statusdetail
白俄罗斯	2017年11月和2013年	https://www.pigprogress.net/.../Belarus-independent-media-report-ASF-outbreaks-208...
科特迪瓦	2017年9月	https://www.oie.int http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/statusdetail
立陶宛	2017年7月	www.xinhuanet.com/english/2017-07/14/c_136442000.htm
捷克	2017年6月	www.izs.it
塞尔维亚	2017年	https://wwwnc.cdc.gov/eid
俄罗斯	2018年 (2007年以来)	www.thepigsite.com http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/
乌克兰	2018年 (2012年以来)	www.thepigsite.com
中非共和国	2017年	http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/statusdetail

表 II：NCBI 收录的 ASF 全基因组信息摘要

名称	收录号	时间	国家	宿主
Odintsovo_02/14	KP843857.1	2014年	俄罗斯	野猪
26544/OG10	KM102979.1	2010年	意大利: Sardinia	家猪
47/Ss/2008	KX354450.1	2008年	意大利: Province ofSassari, Sardinia)	家猪
Georgia 2007/1	FR682468.1	2007年	格鲁吉亚	家猪
Ken06.Bus	KM111295.1	2006年	肯尼亚	家猪
Ken05/Tk1	KM111294.1	2005年	肯尼亚	蜱
OURT 88/3	AM712240.1	1988年	葡萄牙: Alentejo	蜱
Pretorisuskop/96/4	AY261363	1996年	南非: Kruger国家公园	蜱
Malawi Lil-20/1	AY261361	1983年	马拉维: Calaswa	蜱
Mkuzi 1979	AY261362.1	1979年	南非: Mkuzi野生动物保护区	蜱
BA71V	NC_001659.2U18466.2	1971年	西班牙	Vero适应株
NHV	KM262846	1968年	葡萄牙	家猪
Tengani 62	AY261364	1962年	马拉维: Tengani, NsanjeDistrict	家猪
L60	KM262844	1960年	葡萄牙	家猪
Kenya 1950	AY261360	1950年	肯尼亚	家猪
E75	FN557520.1	1975年	西班牙	家猪
warthog	AY261366.1	2003年以前	纳米比亚	疣猪
Warmbaths	AY261365	2003年以前	南非: warmbaths	蜱
Benin 97/1	AM712239.1	1997年	贝宁	家猪

表III：ASF 试验疫苗

疫苗种类	参考文献	保护性	安全性
亚单位疫苗：Immunization of pigs by DNA and recombinant vaccinia virus identify ASFV immunogenic proteins.	J Virol. 2018 pii: JVI.02219-17 9	无	有
减毒活疫苗：Protection of pigs with deletion mutant of MGF genes in ASFV Benin by different doses and routes.	Vaccine. 2018 36: 707-715	有	未检测
减毒活疫苗：Deletion of ASFV Gene DP148R Reduces Virus Virulence in Pigs and Induces Protection against Challenge	J Virol. 2017 91(24). pii: e01428-17	有	未检测
减毒活疫苗：BA71ΔCD2: Recombinant Live Attenuated ASFV with Cross-Protective Capabilities.	J Virol. 2017 91(21). pii: e01058-17	有	未检测
减毒活疫苗：Adapted ASFV strain Congo is a LAV protecting against parental virulent virus.	Arch Virol. 2017 (10): 3081-3088	有	未检测
亚单位疫苗：Adenovirus-vectored novel ASFV antigens elicit robust immune responses in swine.	PLoS One. 2017 12(5): e0177007	未检测	有
亚单位疫苗：Safety and immunogenicity of Modified Vaccinia Ankara vectored ASFV subunit antigens in swine.	Vet Immunol Immunopathol. 2017 Mar;185: 20-33	未检测	有
减毒活疫苗：Naturally attenuated ASFV OURT88/3 protects against virulent homologous field isolate.	Antiviral Res. 2017 138: 1-8	有	无
减毒活疫苗：Simultaneous Deletion of the 9GL and UK Genes from the ASFV Georgia 2007 Isolate Increased Safety and Protection against Homologous Challenge.	J Virol. 2016 91(1). pii: e01760-16	有	未检测
减毒活疫苗：Deletion of 9GL in Pret4 strain protects against challenge with virulent parental isolate	Viruses. 2016 8(10). pii: E291	有	未检测
亚单位疫苗：Induction of Immune Responses in Swine by Using a Cocktail of Adenovirus-Vectored ASFV.	Clin Vaccine Immunol. 2016 23(11): 888-900	未检测	有
减毒活疫苗：Deletion of MGF genes in ASFV Bening isolate reduces virulence in domestic pigs and induces a protective response.	Vaccine. 2016 34(39): 4698-4705	有	未检测
减毒活疫苗：ASFV Georgia isolate harboring deletions of 9GL and MGF360/505 genes is highly attenuated but does not confer protection against parental virus challenge.	Virus Res. 2016 Aug 2;221: 8-14	无	有
减毒活疫苗：ASFV proteins CD2 and Lectine confer serotype-specific protection. A model using adapted attenuated strains.	J Gen Virol. 2015 96(Pt 4): 866-73.	有	未检测
减毒活疫苗：ASFV Georgia 2007 with a Deletion in 9GL gene Leads to Attenuation and Induces an Effective Protection against Homologous Challenge.	J Virol. 2015 89(16): 8556-66	有	无
减毒活疫苗：ASFV Georgia Isolate Harboring Deletions of MGF360 and MGF505 Genes Is Attenuated and Confers Protection against Challenge with Virulent Parental Virus.	J Virol. 2015 89(11): 6048-56	有	未检测

減毒活疫苗: Naturally attenuated ASFV OURT88/3 Induces Protection Against Challenge with Virulent Strains of Genotype I.	Transbound Emerg Dis. 2016 63(5): e323-7	有	无
亚单位疫苗: Inactivated virus and use of Modern adjuvants do not enhance the efficacy of an ASFV vaccine.	Vaccine. 2014 Jun 30;32(31): 3879-82	无	有
減毒活疫苗: 9GL and UK genes deletion from attenuated ASFV OUR T88/3 decreases its ability to protect against challenge.	Virology. 2013 Aug 15;443(1): 99-105	无	未检测
亚单位疫苗: DNA immunization partially protects pigs against sublethal challenge ASFV.	Antiviral Res. 2013 98(1): 61-5	无	有
亚单位疫苗: DNA vaccination partially protects against ASFV lethal challenge.	PLoS One. 2012;7(9): e40942	无	有

表IV：灭活 ASF 病毒的消毒剂

消毒剂	适用范围	浓度	作用时间	参考文献
硫酸	表面消毒剂	1%	15分钟	Fausser-Leiensegger, 2000
	粪液	1%	推荐: 1周	Fausser-Leiensegger, 2000
甲酸	表面消毒剂	1%	15分钟	Fausser-Leiensegger, 2000
	粪液	4%	推荐: 1周	Fausser-Leiensegger, 2000
过氧乙酸	表面消毒剂	2%	15分钟	Fausser-Leiensegger, 2000
甲醛	表面消毒剂	0%	15分钟	Fausser-Leiensegger, 2000
	粪液	1%	推荐: 1周	Fausser-Leiensegger, 2000
	粪液	0.50%	4天以上	Shirai et al., 1999, zitiert im EFSA Scientific Review
十二烷基硫酸钠	表面消毒剂	3%	15分钟	Fausser-Leiensegger, 2000
	粪液	3%	推荐: 1周	Fausser-Leiensegger, 2000
戊二醛溶液	表面消毒剂	1%	30分钟	Fausser-Leiensegger, 2000
	粪液	1%	推荐: 1周	Fausser-Leiensegger, 2000
	组织	0.2%	11天	Cunliffe et al., 1979, zitiert im EFSA Scientific Review
氢氧化钠溶液	表面消毒剂	0.50%	30分钟	Fausser-Leiensegger, 2000
	粪液	4%	推荐: 1周	Fausser-Leiensegger, 2000
	粪液	1%	150秒 (4°C)	Turner und Williams, 1999
	粪液	1%	30分钟 (4°C)	Turner und Williams, 1999
柠檬酸	表面消毒剂	2%	30分钟 (22°C)	Krug et al., 2012
生石灰	粪堆			Bergerdorf et al., 1989, cited by Haas et al., 1995
碘		0, 015 bis 0, 0075 % (碘化钾)		Shirai et al., 1999
邻苯基苯酚		1%	1小时	EFSA Scientific Review; OIE; Stone und Hess, 1973
氯化物, 次氯酸盐	表面消毒剂	0, 03 bis 0, 0075 % 次氯酸钠		Shirai et al., 1999, zitiert im EFSA Scientific Review
	表面消毒剂	2, 3%氯	30分钟	OIE
	表面消毒剂	0.15%/2%次氯酸钠		Krug et al., 2012
季铵化合物	表面消毒剂	0.003%		Shirai et al., 1999, zitiert im EFSA Scientific Review
熟石灰氢氧化钙	粪液	1%	150秒 (4°C)	Turner und Williams, 1999
	粪液	1%	30分钟 (4°C)	Turner und Williams, 1999
热	猪粪浆	65°C	5分钟	Turner und Williams, 1999

附件 I：对策工作组指南

决策模型

我们将使用一个决策模型来评估可能的对策作为储备。这些对策必须显著提高 ASF 无疫国家（如美国）发生疫情后控制和根除 ASF 的能力。决策模型是一个简单的工具，它将使我们能够专注于国家兽医储备的关键标准，并对可用的干预措施进行排序。决策模型以微软 Excel 电子表格格式提供，分配一组选定标准，定量评估这些标准重要性，并选择最高累积分值的选项。我们可以使用任何我们想要的标准，但我们的目标是找到那些能够成功或失败的标准。每一个干预标准均由 ASF 对策工作组选择，但已经确定了一套初步的标准，以加快这一进程。我们鼓励您在参加会议之前审查这些标准，并根据需要与工作组一起修改这些标准。以下是评估疫苗的标准和假设。

标准

如果疫苗被用作控制 ASF 疫情的紧急措施，那么我们需要知道：1) 它是否有效（它是否有效地消除了排毒或只是在一定程度上减少了排毒）；2) 它是否一次免疫就能迅速产生保护（可能没有时间再次进行免疫）；3) 从可靠、快速的生产流程（需要知道它能够快速启动和运行，并生产出期望数量的疫苗）来看，目前是否可行；4) 能否快速安全地将疫苗送到疫情发生地；5) 疫苗一旦到达疫情发生地，能否迅速对目标群进行免疫；6) 免疫方式（群体或注射）、人员和设备对此项工作非常重要；7) 是否有可用的监测并区分感染动物和免疫动物(DIVA)的诊断方法。成本虽然很重要，但在发生疫情时疫苗成本与其他成本相比将很小。此外，疫苗的生产速度也非常重要，因为这对需要的库存量产生重大影响。因此，您将从疫苗评估所用的 Excel 表格中看到，我们提出的下列关键标准和每个标准的权重分配。

权重	关键标准
10	效力
6	安全性
8	单一剂量
6	可扩展速度
2	保质期

2	供应/存储
10	快速启动免疫
8	DIVA兼容性
2	休药期
2	实施成本

附件 II：试验疫苗

ASF试验疫苗

根据对决策的重要性，对每一个干预因素（2，4，6，8 或 10）赋予权重，只允许 1 个权重为“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	效力	10	4	4	2
8	安全性	8	8	4	10
8	单一剂量	8	6	6	2
8	交叉保护	2	2	2	2
10	免疫启动	6	6	6	2
4	配送/供应	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	DIVA兼容性	8	8	8	8
6	保质期	6	6	6	8
6	实施成本	4	8	6	4

对每一个标准（2，4，6，8 或 10）赋予权重，权重“10”最多 2 个。

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
效力	100	40	40	20
安全性	64	64	32	80
单一剂量	64	48	48	16
交叉保护	16	16	16	16
免疫启动	60	60	60	20
配送/供应	32	32	32	32
群体免疫	48	48	48	24
免疫持续时间	48	36	36	24
DIVA兼容性	64	64	64	64
保质期	36	36	36	48
实施成本	24	48	36	24
合计值	556	492	448	368

主要假设

疫苗简介

1. 高效：预防传播；对所有年龄猪有效，对所有 ASF 毒株都能交叉保护；快速产生免疫；1 次免疫，免疫持续期 1 年。

2. 对所有年龄猪都是安全的：活疫苗无毒力返强。
3. DIVA兼容性。
4. 大批量生产方法。
5. 群体免疫代替个体猪接种。
6. 快速量产。
7. 成本合理。
8. 休药期短，利于食品消费。
9. 保质期长。
10. 配送和供应（取决于对稀释剂，和冰柜 VS 冷藏空间的需要）。
11. 实施成本、商品成本、管理成本、仓储成本。

附件III：监测用诊断方法

监测：非洲猪瘟商品化参考诊断方法

根据对决策的重要性，对每一个干预因素（2，4，6，8或10）赋予权重，只允许1个权重为“10”

权重	关键标准	ELISA K3	ELISA OIE	IB（免疫印迹试验）	IIF（间接免疫荧光试验）	实时PCR -King	PCR AGUERO	VI（病毒分离）	DIF（直接免疫荧光试验）	抗原 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	目标适应性	8	8	8	6	8	10	8	8	2
6	可扩展速度	8	6	2	4	8	8	2	4	8
6	通量	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	易操作	8	8	8	4	6	6	2	4	8
6	专业性	10	8	6	2	4	4	2	2	10
4	实施成本	2	10	4	8	4	6	6	8	2

对每一个标准（2，4，6，8或10）赋予权重，权重“10”最多2个。

关键标准	ELISA K3	ELISA OIE	IB（免疫印迹试验）	IIF（间接免疫荧光试验）	实时PCR -King	PCR AGUERO	VI（病毒分离）	DIF（直接免疫荧光试验）	抗原 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
目标适应性	80	80	80	60	80	100	80	80	20
可扩展速度	48	36	12	24	48	48	12	24	48
通量	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
易操作	48	48	48	24	36	36	12	24	48
专业性	60	48	36	12	24	24	12	12	60
实施成本	8	40	16	32	16	24	24	32	8
合计值	500	476	456	420	460	492	392	424	392

主要假设

诊断试验简介

1. 能检测所有ASFV分离株。
2. 直接和间接试验。
3. 特异性大于95%。
4. 敏感性大于95%。
5. 经过验证。
6. 快速检测。
7. 易操作。
8. 可扩展性。
9. 成本合理。
10. 现场检测。
11. 专业性。

附件IV：疫病暴发时的诊断方法

暴发：非洲猪瘟商品化参考诊断方法

根据对决策的重要性，对每一个干预因素（2，4，6，8或10）赋予权重，只允许1个

权重为“10”

权重	关键标准	ELISA K3	ELISA OIE	IB（免疫印迹试验）	IIF（间接免疫荧光试验）	实时PCR -King	PCR AGUERO	VI（病毒分离）	DIF（直接免疫荧光试验）	抗原 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	目标适应性	8	8	8	6	8	10	8	8	2
8	可扩展速度	8	6	2	4	8	8	2	4	8
8	通量	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	易操作	8	8	8	4	6	6	2	4	8
8	专业性	10	8	6	2	4	4	2	2	6
4	实施成本	2	10	4	8	4	6	6	8	2

对每一个标准（2，4，6，8或10）赋予权重，权重“10”最多2个。

关键标准	ELISA K3	ELISA OIE	IB（免疫印迹试验）	IIF（间接免疫荧光试验）	实时PCR -King	PCR AGUERO	VI（病毒分离）	DIF（直接免疫荧光试验）	抗原 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
目标适应性	64	64	64	48	64	80	64	64	16
可扩展速度	64	48	16	32	64	64	16	32	64
通量	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
易操作	48	48	48	24	36	36	12	24	48
专业性	80	64	48	16	32	32	16	16	48
实施成本	8	40	16	32	16	24	24	32	8
合计值	564	532	484	440	544	532	376	436	424

主要假设

诊断试验简介

1. 能检测所有ASFV分离株。
2. 直接和间接试验。
3. 特异性大于95%。
4. 敏感性大于95%。
5. 经过验证。
6. 快速检测。
7. 易操作。
8. 可扩展性。
9. 成本合理。
10. 现场检测。
11. 专业性。

附件 V：监测用实验室诊断方法

监测：非洲猪瘟实验室诊断方法

根据对决策的重要性，对每一个干预因素（2，4，6，8 或 10）赋予权重，只允许 1 个权重为“10”

权重	关键标准	HT-rELISA	p30-rIB	HT-rIB	IPT test	Fast rtimePCR-King
8	敏感性	10	8	8	8	8
10	特异性	8	10	10	8	8
10	目标适应性	8	8	8	6	8
6	可扩展速度	8	2	2	4	8
6	通量	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	易操作	6	8	8	4	8
6	专业性	6	8	8	2	4
4	实施成本	4	2	2	8	4

对每一个标准（2，4，6，8 或 10）赋予权重，权重“10”最多 2 个。

关键标准	HT-rELISA	p30-rIB	HT-rIB	IPT test	Fast rtimePCR-King
敏感性	80	64	64	64	64
特异性	80	100	100	80	80
目标适应性	80	80	80	60	80
可扩展速度	48	12	12	24	48
通量	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
易操作	36	48	48	24	48
专业性	36	48	48	12	24
实施成本	16	8	8	32	16
合计值	476	484	484	420	516

主要假设

诊断试验简介

1. 能检测所有 ASFV 分离株。
2. 直接和间接试验。

3. 特异性大于95%。
4. 敏感性大于95%。
5. 经过验证。
6. 快速检测。
7. 易操作。
8. 可扩展性。
9. 成本合理。
10. 现场检测。
11. 专业性。

附件VI：疫病暴发时的实验室诊断方法

暴发：非洲猪瘟实验室诊断方法

根据对决策的重要性对每一个干预因素（2，4，6，8或10）赋予权重，只允许1个权重为“10”

权重	关键标准	HT-rELISA	p30-rIB	HT-rIB	IPT test	Fast rtimePCR-King
10	敏感性	10	10	10	8	8
8	特异性	8	8	8	8	8
8	目标适应性	8	8	8	6	8
8	可扩展速度	8	2	2	4	8
8	通量	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	易操作	6	8	8	4	8
8	专业性	6	8	8	2	4
4	实施成本	4	2	2	8	4

对每一个标准（2，4，6，8或10）赋予权重，权重“10”最多2个。

关键标准	HT-rELISA	p30-rIB	HT-rIB	IPT test)	Fast rtimePCR-King
敏感性	100	100	100	80	80
特异性	64	64	64	64	64
目标适应性	64	64	64	48	64
可扩展速度	64	16	16	32	64
通量	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
易操作	36	48	48	24	48
专业性	48	64	64	16	32
实施成本	16	8	8	32	16
合计值	572	508	508	440	568

主要假设

诊断试验简介

1. 能检测所有ASFV分离株。
2. 直接和间接试验。

3. 特异性大于95%。
4. 敏感性大于95%。
5. 经过验证。
6. 快速检测。
7. 易操作。
8. 可扩展性。
9. 成本合理。
10. 现场检测。
11. 专业性。

附件 VII：翻译人员

翻译人员：周 智 张成成 兰邹然 黄 兵 张 存 徐守振
张凡建 王忠田 宋建德 张喜悦 徐天刚 王志亮

联系人：王志亮

邮箱：Wanzhiliang@cahec.cn zlwang111@163.com

Translator: Zhou Zhi, Zhang Chengcheng, Lan Zhouran, Huang Bing,
Zhang Cun, Xu Shouzhen, Zhang Fanjian, Wang Zhongtian,
Song Jiande, Zhang Xiyue, Xu Tiangang, Wang Zhiliang.

Contacts: Wang Zhiliang

E-mail: Wanzhiliang@cahec.cn zlwang111@163.com