

# Африканская чума свиней

Отчет по анализу недостаточно изученных аспектов

Ноябрь 2018 г.



Global African Swine Fever  
**Research Alliance**

Целью Глобального альянса по исследованию африканской чумы свиней (GARA) является расширение сотрудничества в области исследований АЧС во всем мире и максимальное использование ресурсов и опыта для достижения своих пяти стратегических целей:

1. Содействовать сотрудничеству в области исследований и служить коммуникационным шлюзом для глобального сообщества, занимающегося исследованиями АЧС.
2. Провести стратегическое исследование с целью расширения знаний об АЧС.
3. Разработать меры контроля следующего поколения и стратегии их применения.
4. Определить социально-экономические последствия реализации улучшенных мер контроля АЧС нового поколения.
5. Предоставить фактические данные для обоснования разработки правил безопасной торговли животными и продуктами животного происхождения в эндемичных по АЧС районах.

Дополнительную информацию о GARA и работе альянса можно найти на следующем веб-сайте: <http://www.ars.usda.gov/GARA>.

Целью данного отчета по анализу недостаточно изученных аспектов в области исследований АЧС является оценка текущих научных знаний и имеющихся мер противодействия для реализации эффективного контроля и смягчения воздействия вспышек АЧС в странах, где таковые вспышки имеют место, а также для поддержки глобальных инициатив по контролю и ликвидации данного заболевания в эндемичных по АЧС странах.

Настоящий отчет по анализу недостаточно изученных аспектов в области исследований АЧС представляет собой сводный документ по четырем семинарам, организованных GARA при поддержке его партнеров.

Пример цитирования настоящего отчета:

Global African Swine Fever Research Alliance (GARA) Gap Analysis Report. 2018: <https://go.usa.gov/xPfWr>

## СОДЕРЖАНИЕ

РЕЗЮМЕ .....	5
ГРУППОВЫЕ ФОТОГРАФИИ.....	8
СЛОВАРЬ.....	11
ВВЕДЕНИЕ .....	13
ПЕРВОИСТОЧНИКИ .....	15
Семинары GARA по анализу недостаточно изученных аспектов .....	15
ОПРЕДЕЛЕНИЕ УГРОЗЫ .....	16
Экономическое влияние.....	16
Эпизоотология .....	16
Эпидемиологический надзор.....	17
Биобезопасность .....	17
Депопуляция .....	17
Вакцины.....	18
Диагностика .....	18
АНАЛИЗ НЕДОСТАТОЧНО ИЗУЧЕННЫХ АСПЕКТОВ.....	19
Вирусология.....	19
Патогенез.....	26
Иммунология .....	30
Вакцины.....	35
Диагностика .....	39
Эпидемиология .....	48
Эпидемиологический надзор.....	51
Дикие свиньи и дикие представители семейства свинье .....	52
Клещи-переносчики .....	52
ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ МЕР ПРОТИВОДЕЙСТВИЯ .....	53
Предпосылки.....	53
Модель решения .....	54
Вакцины.....	56
Диагностика .....	57
Дезинфектанты/Инактивация Вируса .....	60
Акарициды .....	61
Лекарственные препараты.....	61
Средства индивидуальной защиты (СИЗ).....	62



РЕКОМЕНДАЦИИ.....	63
Исследования .....	63
Меры Подготовки .....	66
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	67
ЛИЦА, УЧАСТВОВАВШИЕ В СОСТАВЛЕНИИ ОТЧЕТА.....	68
БИБЛИОГРАФИЯ .....	82

## РЕЗЮМЕ

Глобальный альянс по исследованию африканской чумы свиней (GARA) организовал четыре научные конференции в период с 2013 по 2016 гг. для выполнения анализа недостаточно изученных аспектов с учетом текущего уровня знаний об АЧС, а также имеющихся ветеринарных мерах противодействия для реализации эффективного контроля и смягчения воздействия вспышек африканской чумы свиней (АЧС).

Ключевым и согласованным выводом этих семинаров является то, что, хотя АЧС исторически ограничивалась африканским континентом, существует значительный риск заноса АЧС в Европу, Северную Америку, Южную Америку, Евразию или Азию, который будет иметь разрушительные экономические последствия. Африканская чума свиней является одним из наиболее сложных вирусных заболеваний, поражающих домашних свиней, кабанов и других диких представителей семейства Свиные. Аргасовые клещи считаются биологическим резервуаром и переносчиком данного заболевания. Вирус африканской чумы свиней (ASFV) часто вызывает сложно выявляемую инфекцию в различных популяциях африканских бородавочников и кистеухих свиней.

В настоящее время АЧС является эндемическим заболеванием в более чем двадцати странах Африки к югу от Сахары, и с момента сообщения о вспышке заболевания в Кавказском регионе в 2007 году было объявлено 16 новых случаев заноса в Грузии, Армении, Азербайджане, России, странах Прибалтики, а также Восточной и Центральной Европы. В 2018 году АЧС продолжала распространяться в направлении Западной Европы. Кроме того, в 2018 году о первой вспышке АЧС на своей территории сообщил Китай. Улучшения ситуации с данным заболеванием в указанных странах не наблюдается, что увеличивает риск распространения АЧС в другие страны.

Первоначальная экспрессия АЧС у свиней носит изменчивый и непредсказуемый характер из-за множества факторов, связанных с организмом хозяина, и широкого разнообразия вирулентности среди изолятов вируса АЧС. Вирусные механизмы, вовлеченные в индукцию заболевания, тканевый тропизм, определение круга хозяев и индукцию иммунного ответа, до сих пор недостаточно изучены. Заболевание встречается в нескольких формах, от острого летального до хронического клинического заболевания. Таким образом, клинический диагноз практически невозможен и должен быть дополнен надежными лабораторными инструментами. Гуморальный ответ, вызванный заражением высоковирулентными штаммами вируса, не проявляется по меньшей мере до 7-14 дня после заражения, что может затруднить раннее обнаружение и создавать проблему для программ эпиднадзора. В то же время комбинированное обнаружение вирусного генома и антител обеспечивает надежную диагностику с конца инкубационного периода или даже на несколько более ранних сроках.

GARA определил, что следующие меры противодействия имели важное значение, но выявил несколько их недостатков.

### *Эпидемиологический надзор*

Обычный эпидемиологический надзор с целью раннего выявления заболевания является первой линией защиты от вспышек. Быстрое и точное обнаружение влияет на возможное



время принятия мер контроля, а также на тяжесть вспышки заболевания. Штаммы вируса АЧС могут варьироваться от низко- до высоковирулентных; клинические признаки варьируются от хронической инфекции без явных признаков в эндемичных странах до вспышек острого тяжелого заболевания в странах, ранее свободных от АЧС. Первоначальная экспрессия вируса АЧС у свиней, а также разнообразие вирулентности среди изолятов вируса АЧС в стране, свободной от АЧС, например, США, может варьироваться. Исторически существовало как минимум две программы эпиднадзора: 1) «синдромная» программа эпиднадзора, основанная на сообщении о клинических признаках, и 2) лабораторная программа эпиднадзора, которая включает диагностическое тестирование в популяциях, входящих в группу риска. Недавний опыт ликвидации вспышек АЧС из-за контрабанды зараженных кормов оправдывает ввод в действие нового варианта тестирования и валидации методов обнаружения АЧС в пищевых продуктах, пищевых отходах и обработанных сельскохозяйственных продуктах в рамках лабораторных программ эпиднадзора. Вместе с тем, при таком тестировании следует соблюдать осторожность из-за его чувствительности к размеру выборки и того факта, что отрицательный результат ни о чем не говорит, в то время как положительный результат обнаружения вирусного генома не дает достаточной информации для оценки истинного риска возможного заноса.

### ***Депопуляция***

Депопуляция является основной мерой противодействия, реализуемой в целях снижения выделения вируса в окружающую среду и прекращения распространения вируса АЧС. Минимальные меры контроля должны включать депопуляцию инфицированных стад, эпидемиологический надзор и ограничение передвижения в установленных контрольных зонах, а также надзор за стадами, входившими в контакт с инфицированными стадами. Может быть принято решение о депопуляции контактировавших и соседних стад. Тем не менее, этот метод контроля приводит к значительным финансовым убыткам. Кроме того, вынужденный убой тысяч животных сомнителен с этической точки зрения. Эффективность уничтожения поголовья в отсутствие схемы справедливой и своевременной компенсации весьма сомнительна; т.е., в отсутствие компенсации у владельцев свиней нет никаких стимулов сообщать об инфекции, и вместо этого они будут продавать или забивать своих свиней, способствуя дальнейшему распространению заболевания. Существует потребность во внедрении рациональных и эффективных альтернатив ликвидации поголовья в странах, которые не могут позволить себе выплачивать компенсацию.

### ***Биобезопасность***

Биологическая безопасность на ферме является критической мерой противодействия заносу и распространению АЧС. Оптимальная биобезопасность эффективна за счет контроля за перемещением свиней, людей, оборудования и материалов и потенциальных биологических или механических переносчиков АЧС. Приоритетные меры биобезопасности включают запрет на использование пищевых отходов в качестве корма и локализацию свиней, питающихся отходами, что может быть проблемой в развивающихся странах. Определение источника передачи и попадания в целевое стадо является критически важным шагом в реализации эффективной программы биобезопасности. Однако после принятия мер по ограничению распространения заболевания наиболее



вероятные пути передачи вируса АЧС могут измениться. Поскольку ASFV является арбовирусом, план биобезопасности должен предусматривать процедуры чистки и дезинфекции помещений при наличии клещей *Ornithodoros*; хотя всесторонний план биобезопасности в любом случае должен включать борьбу с насекомыми и вредителями. Количество контактов с животными, являющимися источником вируса, может быть невелико, и распространению заболевания между помещениями могут в равной степени способствовать транспортные средства, контакты с людьми и разъезды для оказания услуг. В эндемичных районах, например, Африке, идеальным решением для коммерческих свиноводческих хозяйств является использование компартиментализации, и оно успешно используется в районах контроля АЧС.

### ***Вакцины***

В настоящее время коммерческая вакцина против ASFV отсутствует (фактически до сих пор не разработана). Хотя формально такие исследования не проводились, ученые знают, что у животных с приобретенным иммунитетом к определенному изоляту вируса, впоследствии подвергающимся воздействию другого гетерологичного штамма, отсутствует перекрестная защита. Это является важной проблемой, которую должны решать как представители научного сообщества, занимающиеся изучением АЧС, так и ветеринарные органы при рассмотрении стратегий вакцинации для контроля и ликвидации АЧС. При рассмотрении возможности вакцинации популяций дикого кабана можно использовать только безопасные живые ослабленные вакцины.

### ***Диагностика***

Подозрение на африканскую чуму свиней обычно основывается на клинических признаках, однако клинические данные могут быть неспецифичными и трудноотличимыми от признаков других инфекционных заболеваний свиней, например, классической чумы свиней. Диагноз основывается на комбинации анализа для выявления возбудителя, например, ПЦР, и серологического теста на специфические антитела, обычно выполняемого методом твердофазного ИФА. В промышленно развитых странах оба указанных средства обнаружения имеются в продаже и позволяют обнаруживать заболевание через три-четыре дня после заражения (с помощью ПЦР) и примерно с 7 по 14 день (с помощью твердофазного ИФА). Подтверждающие тесты пока отсутствуют в продаже.

# ГРУППОВЫЕ ФОТОГРАФИИ

1-й семинар GARA по анализу недостаточно исследованных аспектов

Центр ветеринарии на острове Плам

Ориент-Поинт, Нью-Йорк

6-8 апреля 2013 г.



2-й семинар GARA по анализу недостаточно исследованных аспектов  
ARC - Ондерстепоортский ветеринарный институт  
Претория, Южная Африка  
11-14 ноября 2014 г.



3-й семинар GARA по анализу недостаточно исследованных аспектов  
ANSES – лаборатория в Плуффраган-Плузане  
Плуффраган, Франция  
6-8 сентября 2016 г.



4-й семинар GARA по анализу недостаточно исследованных аспектов  
Институт экспериментальной зоофилактики  
Кальяри, Сардиния, Италия  
11-13 апреля 2018 г.



## СЛОВАРЬ

АНТ: ветеринарный работник младшего или среднего звена

APHIS: Служба инспекции здоровья животных и растений

ARS: Служба сельскохозяйственных исследований

BSL: уровень биобезопасности

ELISA: твердофазный иммуноферментный анализ

АЧС: африканская чума свиней

ASFV: вирус африканской чумы свиней

DIVA: различие инфицированных и вакцинированных животных

FADDL: Лаборатория диагностики экзотических болезней животных

GMP: надлежащая производственная практика

HSPD-9: девятая президентская директива по национальной безопасности

Ig: иммуноглобулин

MLV: модифицированная живая вирусная вакцина

NAHLN: Национальная сеть ветеринарных лабораторий

NVS: Национальный ветеринарный резерв

МЭБ: Всемирная организация здравоохранения животных (Международное эпизоотическое бюро)

ПЦР: полимеразная цепная реакция.

ртПЦР: ПЦР в реальном времени

КПЦР: обычная ПЦР

СИЗ: Средства индивидуальной защиты

## ВВЕДЕНИЕ

Африканская чума свиней (АЧС) является заразной вирусной болезнью домашних свиней, влекущей значительные экономические последствия. В Африке вирус АЧС (ASFV) вызывает сложно выявляемые инфекции у диких животных: бородавочника (*Phacochoerus africanus*), кистеухих свиней (*Potamochoerus larvatus*, *P. porcus*) и большой лесной свиньи (*Hylochoerus meinertzhageni*) (отдельный отчет). Резервуаром ASFV считается аргасовый клещ *Ornithodoros moubata* (Dixon *et al.*, 2005).

Вирус африканской чумы свиней представляет собой крупный оболочечный вирус, содержащий двуцепочечную ДНК длиной приблизительно 190 тысяч пар нуклеотидов. Вирус африканской чумы свиней характеризуется общими аспектами структуры генома и стратегии репликации с другими крупными вирусами, содержащими дцДНК, в том числе *Poxviridae*, *Iridoviridae* и *Phycodnaviridae*. Хотя первоначально считалось, что он относится к иридовирусам (главным образом на основе морфологии вирионов), накопление знаний в области молекулярной биологии ASFV привело к его реклассификации в качестве единственного члена нового семейства ДНК-содержащих вирусов *Asfarviridae* (*Asfar*, возбудитель африканской чумы свиней и родственные вирусы) (Costard *et al.* 2009).

Инфекция, вызываемая вирусом АЧС у домашних свиней, часто приводит к летальному исходу и характеризуется лихорадкой, кровоизлияниями, атаксией и тяжелым общим состоянием. Однако течение инфекции варьируется в зависимости от особенностей организма-хозяина и конкретного штамма вируса. Африканская чума свиней встречается в нескольких формах, от молниеносных до субклинических. Острые формы АЧС, ассоциированные с высоковирулентными штаммами АЧС, характеризуются лихорадкой, пурпурным окрашиванием кожи, множественными кровоизлияниями, расстройством дыхательной системы, нарушением координации движений и смертью через 3–7 дней после заражения. Выживает лишь небольшой процент животных. Подострые и хронические формы болезни характеризуются высокой температурой тела, нарушением координации движений при ходьбе, кашлем, диареей, пурпурным окрашиванием кожи и смертью через 20–45 дней после заражения. При этих формах доля выживших животных более высока; они могут быть ассоциированы со штаммами ASFV, характеризующимися умеренной и низкой вирулентностью, соответственно (Sánchez-Vizcaíno *et al.* 2015a).

Африканская чума свиней считалась болезнью стран Африки к югу от Сахары. Однако в 1957 году АЧС была занесена в Португалию, а затем и в другие европейские страны, а также в некоторые государства Центральной и Южной Америки. В Европе АЧС была ликвидирована в конце 1990-х годов, за исключением итальянского острова Сардиния. Ликвидация была также достигнута в других пострадавших странах за пределами Европы. Однако в 2007 году в Республику Грузия был завезен высоковирулентный штамм вируса АЧС (возможно, с необработанными пищевыми отходами с иностранных судов в порту Потти). Впоследствии данный вирус (Georgia 2007) начал распространяться в Закавказье и достиг Российской Федерации. С самого начала этот вновь занесенный вирус поражал как домашних свиней, так и европейских кабанов. Последние оказались столь же восприимчивыми, как домашние свиньи, что привело к установлению самоподдерживающихся циклов заболевания в популяции кабана. До сих пор такого не



наблюдалось, так как все предыдущие случаи заноса в популяцию европейского кабана были самоограничивающимися при условии отсутствия поддержки за счет сочетанной инфекции и распространения от домашних свиней. Из России вирус распространился дальше и достиг Европейского Союза в 2014 году. В настоящее время неблагополучными являются все прибалтийские государства-члены ЕС, Польша, Румыния, Болгария, Венгрия и Бельгия. Кроме того, ограниченная вспышка произошла среди диких кабанов в Чешской Республике, которая, согласно сообщениям, была ликвидирована совсем недавно. В августе 2018 года заболевание также достигло крупнейшего в мире производителя свиней - Китая. Таким образом, болезнь за последние десять лет покорила три континента. В результате угроза со стороны данного трансграничного заболевания в настоящее время имеет беспрецедентный географический охват, и ее многоотраслевой характер требует включения всех заинтересованных сторон в разработку мер контроля (МЭБ, Справочник по АЧС).

Страны, благополучные по АЧС, в настоящее время применяют изоляцию и упреждающий убой животных в районах вспышек. Несмотря на свою эффективность, изоляция и упреждающий убой приводят к огромным экономическим потерям (Arias and Sanchez-Vizcaino 2002). Вакцина против АЧС отсутствует. Следовательно, выявление и уничтожение инфицированных животных до сих пор является единственным методом контроля и ликвидации АЧС (Costard *et al.* 2009).

# ПЕРВОИСТОЧНИКИ

## **СЕМИНАРЫ GARA ПО АНАЛИЗУ НЕДОСТАТОЧНО ИЗУЧЕННЫХ АСПЕКТОВ**

Настоящий отчет по анализу недостаточно изученных аспектов представляет собой подборку анализов, проведенных в ходе научных конференций, организованных GARA в 2013-2018 гг.:

1-я научная конференция GARA, Центр ветеринарии на острове Плам, Ориент-Пойнт, Нью-Йорк, Соединенные Штаты Америки, 6-8 апреля 2013 г.

2-я научная конференция GARA, Совет по сельскохозяйственным исследованиям, Претория, Южная Африка, 10-14 ноября 2014 г.

3-я научная конференция GARA, ANSES, Плуффаган, Франция, 6-8 сентября 2016 г.

4-я научная конференция GARA, Институт экспериментальной зоофилактики, Кальяри, Сардиния, Италия, 11-13 апреля 2018 г.

Анализ недостаточно изученных аспектов, выполненный экспертами по АЧС, определялся представленными обновленными отчетами об исследованиях, представленных 44 научно-исследовательскими институтами из 34 различных стран мира, в сочетании с обзорами научной литературы. Используя эту информацию, были определены приоритетные области для исследования ASFV.

### **Обновления отчета**

Этот отчет будет периодически обновляться путем внесения новой научной информации, сведений о важных научных достижениях и / или успешной разработке ветеринарных мер противодействия. Этот отчет последний раз обновлялся при поддержке GARA в декабре 2018 года.

### **СПРАВОЧНЫЙ МАТЕРИАЛ**

GARA рекомендует использовать следующие веб-сайты и отчеты в качестве информации о текущем уровне знаний в области биологии, эпидемиологии АЧС и борьбы с ней:

1. <https://www.ars.usda.gov/GARA/> (официальный сайт GARA)
2. <http://www.fao.org/docrep/004/y0510e/y0510e00.HTM> (ФАО: Планы действий в чрезвычайных ситуациях, связанных с АЧС)
3. <http://www.oie.int/wahis/public.php?page=disease> (интерфейс WAHIS)
4. <http://athena.bioc.uvic.ca/organisms/Asfarviridae> (Вирусная биоинформатика: Asfarviridae).
5. <http://www.fao.org/3/a-i7228e.pdf> (Руководство ФАО: Обнаружение и диагностика)
6. <http://www.fao.org/ag/againfo/programmes/en/empres/ASF/index.html> (Ресурсы, связанные с АЧС)
7. [http://web.oie.int/RR-Europe/eng/eng/Regprog/docs/docs/GF-TADs%20Handbook\\_ASF\\_WILDBOAR%20version%202018-09-25.pdf](http://web.oie.int/RR-Europe/eng/eng/Regprog/docs/docs/GF-TADs%20Handbook_ASF_WILDBOAR%20version%202018-09-25.pdf) ((Справочник по АЧС у дикого кабана и биобезопасность во время охоты)
8. <http://asf-referencelab.info/asf/en/procedures-diagnosis/sops> (Референтная лаборатория Европейского Союза по АЧС)

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ УГРОЗЫ

В настоящее время угроза заноса африканской чумы свиней (АЧС) в новые географические регионы высока как никогда. Со времени заноса АЧС в Республику Грузия в 2007 году 16 стран за пределами Африки сообщали о вспышках АЧС (таблица 1). Продолжение распространения АЧС в Африке, России, Европе, а теперь и в Китае, обуславливает постоянную угрозу заноса АЧС в страны, ранее благополучные по АЧС. Потенциальные пути заражения включают: 1) импорт зараженных продуктов свиноводства, полученных из домашних свиней, которых кормили загрязненными пищевыми отходами, 2) распространение вируса в новые географические районы с зараженными свиньями и дикими кабаном и 3) случайные или целенаправленные злонамеренные действия.

### *ЭКОНОМИЧЕСКОЕ ВЛИЯНИЕ*

Занос АЧС в страны за пределами Африки имел значительные экономические последствия для свиноводства. Основным следствием заноса АЧС является потеря статуса для международной торговли и внедрение радикальных и дорогостоящих стратегий борьбы с данным заболеванием (Costard *et al.*, 2009). На Кубе занос этой болезни в 1980-х годах повлек общие потери в размере 9,4 млн. долл. США (Simeon-Negrin and Frias-Lepoureau 2002). В Испании, по оценкам, только за последние 5 лет программы ликвидации было истрчено 92 миллиона долларов (Arias and Sanchez-Vizcaino 2002). Учитывая влияние на производство и торговлю свининой, а также затраты на ликвидацию, Рендлман и Спинелли в 1994 году подсчитали, что чистая выгода от предотвращения заноса АЧС в Соединенные Штаты составит почти 450 млн. долл. США, что составляет почти 5 процентов от общей стоимости продаж продуктов свиноводства. В эндемичных странах АЧС имеет огромные экономические последствия как для отдельных фермеров (особенно мелких производителей), так и в национальном масштабе (Fasina *et al.*, 2012). В Африке негативное воздействие данного заболевания также является значительным, особенно для многочисленных бедных домохозяйств, реализация жизненных потребностей которых зависит от свиней.

### *ЭПИЗООТОЛОГИЯ*

Африканская чума свиней может демонстрировать уникальные региональные модели проявления, связанные с уникальным набором факторов риска, которые следует оценивать при установлении надлежащих стратегий эпиднадзора и контроля. Эпизоотология АЧС варьируется в зависимости от двух типов циклов передачи в популяциях свиней, определяемых как цикл у домашних свиней и цикл у лесных и диких свиней. К этому добавился дополнительный экологический цикл, который включает проблему дикого кабана и присутствие вируса в окружающей среде, что наблюдается в странах Балтии и Центральной Европе. Первоначальная экспрессия АЧС в ранее благополучной по АЧС стране может быть изменчивой и непредсказуемой из-за множества факторов, связанных с хозяевами, и широкого разнообразия вирулентности среди штаммов вируса АЧС. Кроме того, наличие компетентных переносчиков-членистоногих также может влиять на поддержание вируса в окружающей среде.

## **ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЙ НАДЗОР**

Эпидемиологический надзор является наиболее важной мерой противодействия, позволяющей полностью ликвидировать заболевание путем раннего выявления и локализации вспышки заболевания. Тем не менее, для выявления различных клинических проявлений, вызванных инфекцией АЧС, необходимы разные стратегии эпизоотологического надзора. При острой инфекции действия по надзору могут основываться на клинических признаках; однако для легких случаев или хронических инфекций, где распознавание симптомов АЧС является менее вероятным, действия по надзору должны основываться на диагностическом анализе, дополняющем надзор на основании клинических признаков. Пассивное наблюдение часто является единственным экономически жизнеспособным решением для многих стран, однако у него есть недостатки из-за сложности дифференциации АЧС от многих распространенных эндемических инфекционных заболеваний. Пассивное наблюдение можно значительно усовершенствовать путем проведения информационных кампаний, адресованных всем заинтересованным сторонам в цепочке создания стоимости в свиноводстве, а также путем создания справедливых планов компенсации для стимулирования предоставления информации о случаях заболевания. Программы активного наблюдения являются затратными, и в настоящее время из-за проблем и недостатков иммунологических методов анализа они должны опираться на прямые диагностические тесты, например, выделение вирусов и генетический анализ.

## **БИОБЕЗОПАСНОСТЬ**

Внедрение мер биобезопасности на ферме является одной из наиболее важных мер противодействия, направленных на профилактику и защиту коммерческой деятельности в области свиноводства; вместе с тем, кампания по ликвидации также должна включать и использовать специальные меры по предотвращению дальнейшей передачи и географического распространения вируса за счет транспорта и межличностных контактов. Основной целью плана биологической безопасности является уменьшение вероятности заражения и значительное снижение затрат, связанных с гибелью животных (Fasina *et al.*, 2012). Для достижения целей, поставленных в плане биобезопасности, необходимо принять комплекс мер ветеринарно-санитарного назначения. Чем больше количество реализованных мер, тем выше стоимость, однако это оправдано при вспышке заболевания (Fasina *et al.*, 2012). Кодекс здоровья наземных животных МЭБ (глава 15.1 и главы 4.3 и 4.4) содержит рекомендации по созданию помещений, свободных от АЧС.

## **ДЕПОПУЛЯЦИЯ**

Депопуляция является основной мерой противодействия для снижения вирусывыделения и прекращения распространения вируса АЧС. Минимальные меры контроля должны включать депопуляцию инфицированных стад, наблюдение и ограничение передвижения в установленных контрольных зонах, а также наблюдение за стадами, которые контактировали с инфицированными стадами. Возможна депопуляция контактировавших и соседних стад. Таким образом, этот метод контроля приводит к значительным финансовым затратам; кроме того, убой тысяч животных также сомнителен с этической точки зрения. Эффективность вынужденного убоя в отсутствие схемы справедливой и своевременной компенсации весьма сомнительна; т.е., в отсутствие компенсации у



владельцев свиней нет никаких стимулов сообщать об инфекции, и вместо этого они будут продавать или забивать своих свиней, способствуя дальнейшему распространению заболевания. Нехватка средств для выплаты компенсаций владельцам, особенно при убойе здоровых свиней в соседних помещениях, также является проблемой в небогатых странах. Существует потребность во внедрении рациональных и эффективных альтернатив ликвидации поголовья в странах, которые не могут позволить себе выплачивать компенсацию. При реализации данного подхода скорость депопуляции инфицированных стад, включая утилизацию туш и дезинфекцию помещений, может влиять на распространение заболевания, продолжительность вспышки и общую эффективность мер контроля (Boklund *et al.*, 2009). Эта мера контроля эффективна в странах или географических регионах, где свиньи содержатся в четко определенных помещениях или на свинофермах. В районах, где домашние свиньи содержатся на свободном выгуле и питаются пищевыми отходами, депопуляция может быть затруднена.

### **ВАКЦИНЫ**

Вакцина против АЧС отсутствует, и борьба с заболеванием в основном зависит от ветеринарного карантина, мер биологической безопасности и убоя скота. Таким образом, имеется серьезный пробел с точки зрения наличия ветеринарно-санитарных мер противодействия для эффективной профилактики, контроля или ликвидации вспышек АЧС. Некоторые из проблем при разработке вакцины связаны со следующими техническими препятствиями: 1) ASFV является одним из крупнейших известных ДНК-содержащих вирусов, несущим большое количество вирусных генов с неизученными или известными функциями; 2) отсутствуют линии клеток для культивирования ASFV с целью производства вакцин; 3) существует несколько генотипов ASFV с различными фенотипическими характеристиками, при этом экспериментальные вакцины, протестированные на сегодняшний день, не обеспечивают перекрестную защиту или обеспечивают ее в недостаточной степени; 4) вакцина необходима для парентерального введения домашним свиньям и перорального введения при вакцинации диких свиней и диких кабанов, а также, возможно, других диких представителей семейства свиных при наличии энзоотического цикла, хотя известно, что дикие представители семейства свиных в Африке довольно устойчивы к вирусам АЧС.

### **ДИАГНОСТИКА**

Подозрение на африканскую чуму свиней обычно основывается на клинических признаках, однако клинические данные могут быть неспецифичными и трудноотличимыми от признаков других эндемических и трансграничных инфекционных заболеваний, например, классической чумы свиней. Важным инструментом для достижения этой цели является обычная ПЦР и ПЦР в реальном времени, используемые одновременно с твердофазным ИФА для выявления антител. Важное значение имеет серологическая и вирусологическая дифференциация других этиологических агентов, вызывающих АЧС-подобные заболевания. Доступные тесты на основе твердофазного ИФА особенно полезны при необходимости исследования большого количества образцов. Существует потребность в тестах для раннего выявления антигена, которые можно использовать во время вспышек для быстрого принятия решений о состоянии проверяемого стада на местах.



# АНАЛИЗ НЕДОСТАТОЧНО ИЗУЧЕННЫХ АСПЕКТОВ

В следующем разделе приведена обобщенная информация о вирусе африканской чумы свиней, пробелах в наших знаниях и необходимых исследованиях.

## **ВИРУСОЛОГИЯ**

Вирус африканской чумы свиней (ASFV) - это крупный оболочечный вирус, содержащий двуцепочечную (дц) ДНК размером приблизительно 190 тысяч пар оснований (т.п.о.). ASFV кодирует новые гены, участвующие в модуляции иммунного ответа хозяина, вирулентности вируса для домашней свиньи и в способности ASFV реплицироваться в организме переносчика-клеща и распространяться им. ASFV характеризуется общими аспектами структуры генома и стратегии репликации с другими крупными вирусами, содержащими дцДНК, в том числе *Poxviridae*, *Iridoviridae* и *Phycodnaviridae* (Dixon *et al.*, 2000 и 2008). ASFV и поксвирусы реплицируются в цитоплазме инфицированной клетки, в первую очередь, на отдельных околядерных сайтах сборки, называемых вирусными фабриками. Они также демонстрируют временную регуляцию экспрессии генов и содержат сходные геномные структуры, в том числе концевые инвертированные повторы, концевые перекрестные связи, центральную консервативную область и вариабельные области на каждом конце генома (Dixon *et al.* 2008). Хотя первоначально считалось, что он относится к иридовирусам (главным образом на основе морфологии вирионов), накопление знаний в области молекулярной биологии ASFV привело к его реклассификации в качестве единственного члена нового семейства ДНК-содержащих вирусов *Asfarviridae* (*Asfar*, возбудитель африканской чумы свиней и родственные вирусы) (Dixon *et al.* 2000).

Вирион ASFV состоит из более чем 50 полипептидов и имеет сложную, но правильную структуру, установленную с помощью электронной микроскопии, икосаэдрическую по симметрии и содержащую несколько концентрических слоев общим диаметром приблизительно 200 нм (Breese and DeBoer 1966; Carrascosa *et al.*, 1984, 1985; Estevez *et al.*, 1986 и 1987; Schloer, GM, 1985). Ядро вириона размером 80 нм состоит из нуклеоида (Andres *et al.*, 1997 и 2002). Вокруг нуклеоида находятся два липидных бислоя (Andres *et al.*, 1997 и 1998; Rouiller *et al.*, 1998). Снаружи по отношению к внутренней мембране находится капсид, состоящий из структурного белка р72 (также называемого р73), который составляет приблизительно одну треть от содержания общего белка в вирионе и обеспечивает икосаэдрическую структуру вириона (Andres *et al.*, 1997; Carrascosa *et al.*, 1986; Garcia-Escudero *et al.*, 1998; Tabares *et al.*, 1980a). Капсид покрыт рыхлой наружной мембраной, образующейся при выходе вируса через плазматическую мембрану, которая не требуется для вирусной инфекции (Andres *et al.*, 2001; Breese and DeBoer 1966; Carrascosa *et al.*, 1984; Moura Nunes *et al.*, 1975).

Аналогично вирионам поксвирусов, вирионы ASFV содержат ферменты, которые участвуют в ранних событиях репликации вируса в цитоплазме клетки и имеют важное значение для нее, в том числе РНК-полимеразу, нуклеозидтрифосфатфосфогидролазу, топоизомеразу, ферменты мРНК-кэппинга и протеинкиназу (Kuznar *et al.*, 1980 и 1981; Polatnick 1974; Salas *et al.*, 1981 и 1983).



Сообщалось о геномной гетерогенности африканских изолятов ASFV, ассоциированных со вспышками заболевания у домашних свиней, по сравнению с изолятами, выделенными от клещей (Dixon and Wilkinson, 1988; Sumption *et al.*, 1990). Последующие молекулярно-филогенетические исследования с использованием фрагмента гена p72 подтверждают некоторые из этих результатов, в том числе относительную гомогенность среди изолятов из Западной Африки, Европы и Америки, гомогенность среди некоторых африканских линий, ассоциированных со вспышками у домашних свиней, и относительную гетерогенность среди изолятов из Южной и Восточной Африки (Bastos *et al.*, 2003; Lubisi *et al.*, 2003; Wambura *et al.*, 2006).

Тем не менее, белки ASFV довольно консервативны между различными изолятами. Установлено, что центральное геномное ядро является относительно консервативным у различных изолятов вируса. В него входят мембранные и другие структурные белки, заведомо присутствующие в вирусной частице, а также белки, которые, согласно последним сведениям, влияют на различные стадии морфогенеза вирионов в инфицированной клетке (Afonso *et al.*, 1992; Alcamí *et al.*, 1992 и 1993; Brookes *et al.*, 1998b; Camacho and Viñuela 1991; Lopez-Otin *et al.*, 1988 and 1990; Munoz *et al.*, 1993; Rodriguez *et al.*, 1994; Simon-Mateo *et al.*, 1995; Sun *et al.*, 1995 and 1996). Другие белки ASFV обладают последовательностями, сходными с клеточными белками или ферментами; к ним относятся белки, вовлеченные в различные аспекты метаболизма нуклеотидов, репликации, репарации и транскрипции ДНК и модификации белков, а также белки, вероятно, ответственные за ферментативные активности, присутствующие в вирионах ASFV или индуцируемые в инфицированных клетках ( Baylis *et al.*, 1992, 1993a; Blasco *et al.*, 1990; Bournsnel *et al.*, 1991; Freije *et al.*, 1993; Hammond *et al.*, 1992; Lu *et al.*, 1993; Martin Hernandez and Tabares 1991; Martins *et al.*, 1994; Rodriguez *et al.*, 1993b; Yanez 1993; Yanez *et al.*, 1993a, 1993b и 1993c). Некоторые из этих белков, по-видимому, обладают отдаленным родством с гомологами, выявленными у поксвирусов (Baylis *et al.*, 1993b; Blasco *et al.*, 1990; Bournsnel *et al.*, 1991; Freije *et al.*, 1993; Martin Hernandez and Tabares 1991; Roberts *et al.*, 1993; Yanez *et al.*, 1993b). Дополнительные ферментативные компоненты, кодируемые геномом ASFV, включают гомологи клеточного убиквитин-конъюгирующего фермента, транс-пренилтрансферазы, NifS-подобного белка и компоненты пути репарации посредством эксцизии оснований (Hingamp *et al.*, 1992; Rodriguez *et al.*, 1992). ASFV также кодирует белки, которые, согласно прогнозам, могут опосредовать взаимодействие вирус-хозяин, вирулентность и механизмы, которые усиливают способность вируса успешно реплицироваться в организме хозяина, включая гомологи клеточного ингибитора апоптоза (IAP), Vcl-2, I каппа В (ИКВ), антигена дифференцировки миелоидных клеток при первичном ответе MyD116, лектиноподобного белка и CD2 (Borca *et al.*, 1994b; Neilan *et al.*, 1993a; Rodriguez *et al.*, 1993a; Sussman *et al.*, 1992). Примечательно, что некоторые из этих предполагаемых белков вирулентности / круга хозяев, а также некоторые белки мультигенного семейства (MGF), белок 9-RL центральной варибельной области (указанный как pB602L в BA71V) и структурный белок p54, содержащий варибельный тандемный повтор (pE183L) (Irusta *et al.*, 1996; Rodriguez *et al.*, 1994; Sun *et al.*, 1995), являются одними из самых варибельных белков между различными полевыми изолятами.

Недавно в нескольких сообщениях опубликованы новые данные о роли нескольких вирусных белков, которые ранее были частично исследованы или не были исследованы. Некоторые из этих белков имеют важное значение для репликации вируса, например, фермент конъюгации убиквитина E2 I215L (Freitas *et al.*, 2018), вирусный фермент декэппинга D250R или g5R (Quintas *et al.*, 2017), вирусный гистон-подобный белок pA104R (Frouco *et al.*, 2017), белок A179L, индуцирующий апоптоз (Banjara *et al.*, 2017), белок вирусной топоизомеразы II (Freitas *et al.*, 2016) и вирусный белок Ep152R с неизвестной функцией, за исключением его специфического связывания с белком BAG6 хозяина (Vorca *et al.*, 2017), который, согласно ранее опубликованному описанию, имеет важное значение для репликации вируса.

В последние несколько лет также привлекает внимание процесс репликации вируса. Помимо важности вирусных белков, описанных выше, рассмотрена важность предполагаемого клеточного рецептора CD163 в опосредовании вирусной инфекции в культурах макрофагов свиней и репликации *in vivo* у свиней. Рекомбинантные свиньи, лишенные CD163, не отличались от своих нормальных аналогов в отношении восприимчивости к вирусной инфекции и были полностью восприимчивы к ASFV (Popescu *et al.*, 2017), что явно указывает, по крайней мере, на альтернативный путь проникновения вируса в чувствительные клетки. Кроме того, показано, что клеточная везикулярная система, а также убиквитин-протеасомная система (Barrado Gil *et al.*, 2017) играют важную роль во время репликации вируса (Cuesta-Geijo *et al.*, 2012, 2016, 2017).

### **Недостаточно изученные аспекты**

Несмотря на существование только одного вида вируса, в настоящее время описано 24 его генотипа, причем генотипы 23 и 24 описаны в 2017 и 2018 гг., соответственно (Achenbach *et al.* 2017; Quembo *et al.* 2018); однако это обозначение основано на секвенировании одиночного гена. Имеются подтверждения, что полногеномное секвенирование гена p54 является ценным дополнительным методом генотипирования для молекулярно-эпидемиологических исследований. Расширенное различие штаммов достигается путем анализа центральной варибельной области (CVR) в гене B602L, согласно описаниям, представляющем собой наиболее изменчивый локус для различения близкородственных изолятов и выявления подгрупп в нескольких из 24 генотипов (Gallardo *et al.*, 2009). Очевидно, что существуют значительные различия в размерах генома, вирулентности и иммуногенности (с учетом отсутствия перекрестной защиты), однако количество сведений о генах, ответственных за вирулентность, круг хозяев и взаимодействие вирус-переносчик-хозяин, невелико.

Недостаточное количество доступных последовательностей геномов ASFV и геномов видов-хозяев, восприимчивых к ASFV

Другим важным недостатком является отсутствие доступных последовательностей геномов ASFV и геномов видов-хозяев, восприимчивых к ASFV. В настоящее время имеется очень мало полноразмерных геномных последовательностей изолятов ASFV, депонированных в общеизвестные базы данных, и только девятнадцать из них доступны в NCBI (Национальный центр биотехнологической информации). Сводная информация об этих штаммах, включая дату их сбора, страну происхождения и хозяина, из которого они были



выделены, приведена в таблице II. Эти крайне ограниченные данные о последовательностях были получены из шести изолятов, выделенных из клещей, десяти изолятов от домашних свиней, одного - от бородавочников и одного - от диких кабанов. Отсутствие разноплановой информации о последовательностях позволяет лишь весьма ограниченно интерпретировать различия между разными изолятами. Основные пробелы, выявленные в имеющихся данных полногеномного секвенирования изолятов АЧС, заключаются в следующем:

- 1) изоляты имеют различное происхождение и выделены от различных хозяев, в том числе домашних свиней, дикого кабана, бородавочника и клещей.
- 2) Изоляты, имеющие естественное происхождение, или выведенные в лаборатории ослабленные изоляты
- 3) Эволюция изолятов из эндемичных областей как по времени, так и по расстоянию.
- 4) Полевые штаммы от нынешних вспышек в Африке

Интересная информация, связанная с аттенуированным фенотипом ASFV генотипа II, обнаруженным в Эстонии, была представлена на конференции в Плуфрагане (Zani *et al.*, 2016). Этот вирус был повторно выделен от экспериментально инфицированного кабана в клинической фазе инфекции. Это животное впоследствии выздоровело и к концу исследования давало отрицательный результат при анализе на вирус и положительный - на антитела. Контакт этого выжившего животного со свиньями-сентинелами не привел к передаче болезни, несмотря на то, что на момент контакта у кабана еще выявлялся вирусный геном. Данный изолят вируса дополнительно протестировали на мини-свиньях, домашних свиньях и европейских кабанах. В то время как в первом случае заболевание протекало в очень легкой форме, все дикие кабаны погибли, демонстрируя острый летальный ход заболевания. Этот вирусный штамм характеризовался крупной делецией на 5'-конце генома и реорганизацией. В настоящее время проводятся дальнейшие исследования, однако необходимо знать о возможности легкого течения заболевания. Интересно, что данный вариант вируса обнаруживался в полевых условиях лишь в течение очень короткого периода, что указывает на неблагоприятный цикл заболевания. Аналогичные ослабленные вирусные штаммы были зарегистрированы и в других странах Балтии, что требует дальнейших исследований.

Геномы восприимчивых видов-хозяев являются дополнительным серьезным пробелом в исследованиях АЧС. В то время как в NCBI имеется четырнадцать отдельных геномов пород *Sus scrofa*, последовательности генома диких и домашних свиней, кабанов и бородавочников в районах вспышек в Африке и Европе остаются в значительной степени неисследованными. С целью выявления геномных исследований для выявления факторов, способствующих устойчивости у некоторых из этих пород, необходимо провести крупномасштабное секвенирование. Основные объекты должны включать виды и подвиды как домашних, так и диких свиней в эндемичных регионах или в районах вспышек, а также геномные последовательности животных, которые способны выжить во время вспышки.

Хотя недавние достижения в области секвенирования нового поколения оказались полезными для секвенирования как ASFV, так и геномов хозяев, основные текущие проблемы обусловлены большими затратами и объемами работ, связанных не только с пробоотбором, но и с секвенированием и построением крупных геномов. Упрощение и



удешевление секвенирования генома ASFV возможно за счет оптимизации протоколов отделения вирусной ДНК от ДНК хозяина. Без этой информации функциональные геномные исследования ограничиваются только определенным штаммом, используемым в отдельной лаборатории. По мере повышения доступности этой информации она позволит лучше прогнозировать потенциальную перекрестную защиту от различных изолятов и эволюцию вируса как во времени, так и во время отдельных вспышек.

Транскриптомика ASFV и хозяина на различных стадиях инфекции

ASFV содержит 150-170 ОРС (открытых рамок считывания), однако большинство из этих ОРС являются лишь теоретическими, и для очень немногих из них получены экспериментальные доказательства на уровне РНК или белка. Хотя вполне вероятно, что большинство этих ОРС действительно продуцируют белковый продукт, возможно, что профили экспрессии этих вирусных генов могут меняться в зависимости от изолята и отличаться в зависимости от инфицированного хозяина, что может объяснять различный исход ASFV - от 100% смертности до субклинических инфекций. Однако на сегодняшний день опубликованная информация об РНК- или белковых профилях экспрессируемых генов ASFV отсутствует даже на экспериментальном уровне или уровне *in vitro*.

В Плурфранге (Jaing и соавт., 2016) представлен анализ профиля экспрессии генов, основанный на РНК из цельной крови свиней, инфицированных низко- и высокопатогенным ASFV. RNAseq-анализ позволил выявить 395 генов, экспрессия которых наиболее различалась в день эвтаназии при инфекции высокопатогенным штаммом Georgia 2007, и 181 ген, экспрессия которых менялась к 7-му дню после инфицирования в аттенуированной группе OURT88/3. 20 генов, которые характеризовались максимальной изменчивостью экспрессии между обеими группами, представляли собой гены, связанными с маркерами макрофагов, маркерами естественных киллеров, хемокинами и другими важными маркерами иммунного ответа.

Еще один недочет связан с отсутствием информации о лигандах рецептора(ов), который(е) вирус использует для заражения макрофагов свиней. Возможно, что некоторые молекулы действуют при инфекции в качестве рецепторов и корецепторов. Одним из генов-кандидатов является CD163, скэвенджер-рецептор, который экспрессируется зрелыми макрофагами и коррелирует с восприимчивостью к инфекции ASFV. Тем не менее, использование свиней, подвергшихся генетическому редактированию с помощью CRISPR/Cas9, несущих мутированный CD163, показало, что рекомбинантные свиньи без CD163 сохраняли восприимчивость к инфекции без изменений вирулентности вируса; это свидетельствует о том, что CD163 не является рецептором для ASFV (Popescu *et al.* 2017). Сообщалось, что использование выделенной стабильной клеточной линии кабанов (WSL) для культивирования адаптированного ASFV из нескольких изолятов является полезным инструментом для культивирования вируса в культуре клеток, поскольку при полномасштабном секвенировании этих вирусных геномов после последовательных пересевов нескольких изолятов вируса АЧС не обнаружено крупных делеций в геноме (Keil *et al.*, 2016).

Эти новые сообщения расширяют знания о механизмах инфицирования и должны способствовать пониманию вирус-индуцированного иммунитета и выявлению новых



генов-кандидатов для вакцинации. Однако новые экспериментальные данные нуждаются во всестороннем изучении; необходимо понять, как вирус взаимодействует с хозяином на клеточном уровне.

Одним из основных выявленных недочетов было то, что глобальные профили экспрессии клеток-хозяев, инфицированных АЧС, были определены не полностью. Эту информацию можно было бы использовать для определения реакции хозяина на вирусную инфекцию, а также путей метаболизма, активных или неактивных во время вирусной инфекции. Эксперименты такого типа можно было бы использовать для сравнения реакции клеток-хозяев на различные штаммы, например, для сравнения ослабленного штамма ASFV с исходным вирулентным вирусом. Эта информация могла бы позволить получить дополнительные знания о природных или полученных в лаборатории ослабленных изолятах ASFV. Понимание этой информации может помочь исследованию механизмов ослабления этих вирусов. Кроме того, изучение реакций клеток хозяина на клеточном уровне могло бы обеспечить сбор этой информации и ее сопоставление с реакцией в организме хозяина.

Расширение знаний о транскриптомике ASFV и хозяина, инфицированного ASFV, должно обеспечить получение новых знаний об изменчивости штаммов вируса АЧС и иммунного ответа на вирус в зависимости от изолятов вируса и вида хозяина.

#### Функциональная геномика белков ASFV

Большинство белков ASFV обладают ограниченным количеством экспериментально доказанных функций; его функциональная геномика ограничена, в основном, прогнозами на основе консервативных белковых последовательностей или доменов белков вирусов других семейств или хозяина. Недостаточное количество экспериментально доказанных функций является серьезным пробелом в исследованиях АЧС. Понимание роли белков ASFV во время инфекции имеет решающее значение для понимания как патогенеза АЧС, так и механизмов, лежащих в основе способности ASFV избегать обнаружения иммунной системой хозяина и вызывать заболевание. Исследование функций любого конкретного белка ASFV не должно останавливаться на этапе прогноза функций, и выявление белков, взаимодействующих с данным конкретным белком, как среди белков вируса, так и хозяина, является основным пробелом в исследованиях ASFV. На сегодняшний день существует очень мало сообщений о взаимодействии белков хозяина и вируса.

На семинаре GARA по анализу недостаточно изученных аспектов в Плоуфрагане, Франция, была опубликована некоторая актуальная информация, касающаяся ранее неизученной функции гена ASFV Ep152R и его взаимодействия с клеточным белком Bagb (Borca *et al.*, 2016). Кроме того, сообщалось о выявлении механизма сбрасывания оболочки вируса при его проникновении в клетку посредством эндоцитоза и некоторых веществ в клетке, имеющих отношение к этому процессу (Cuesta-Geijo *et al.*, 2016). Кроме того, сообщалось о ранее неустановленной роли механизмов врожденного иммунитета, связанных с интерферон-индуцированными белками, способными ингибировать проникновение вируса в цитоплазму из эндосомы, называемыми IFITM- белками (Muñoz-Moreno *et al.*, 2016). Кроме того, сообщалось о выделении частиц ASFV и исследовании характеристик протеома зрелых внеклеточных вирионов АЧС с использованием масс-



спектрометрического подхода, а также о выявлении новых структурных белков ASFV, как вирусных, так и происходящих от белков хозяина (Kessler et al, 2016).

Четкое понимание функции белков ASFV и той роли, которую они играют во время инфекции, в частности, механизмов уклонения ASFV от иммунного ответа, имеет решающее значение для разработки живой ослабленной вакцины. Крупномасштабные функциональные геномные исследования представляют собой значительную часть этих потенциальных возможностей, которые можно реализовать либо с помощью прямых методов выявления белок-белковых взаимодействий, например, двухгибридной дрожжевой системы или совместной иммунопреципитации (Co-IP) с последующей масс-спектроскопией. Дополнительную ценность представляет очистка вирусных белков и их анализ *in vitro* для подтверждения прогнозируемых функций.

#### Геномный скрининг хозяев для определения факторов вирулентности ASFV

Современные технологии позволили выполнить крупномасштабный геномный скрининг многих других вирусов, однако на сегодняшний день сообщения о таком скрининге для ASFV отсутствуют, что представляет собой крупный пробел в исследованиях ASFV. Для этого геномного скрининга необходимы реагенты, специфичные по отношению к организму свиней; например, скрининговые исследования потери функции генов за счет скрининга мРНК или скрининга CRISPR/Cas9 требуют наличия библиотек, специфичных по отношению к геному свиньи. Разработка таких библиотек необходима для достоверных крупномасштабных геномных скрининговых исследований ASFV *in vitro*. Эти скрининговые исследования могли бы позволить получить представление о путях метаболизма у хозяина, которые имеют важное значение для репликации ASFV, и к открытию вирусных клеточных рецепторов, иммунных маркеров инфекции, а также путей, участвующих в репликации вируса и вирулентности вируса. Эта информация могла бы способствовать пониманию тропизма вирусных клеток и, таким образом, разработке клеточных линий, которые поддерживают репликацию вируса, а также улучшению понимания патогенеза вируса.

#### Аспекты, нуждающиеся в исследовании

##### 1) геномные последовательности ASFV:

Современные технологии секвенирования ДНК могли бы обеспечить относительно легкое и дешевое секвенирование полных геномов 1) 1-3 изолятов каждого генотипа, 2) серии вирусов (>10) с различной вирулентностью и 3) серии вирусов (>5), реплицировавшихся исключительно у домашних свиней, диких свиней и клещей.

##### 2) ресурс по биоинформатике ASFV:

Необходимо продолжить аннотирование и анализ геномов ASFV. Диапазон размеров ASFV создает дополнительные сложности и требует специализированных инструментов. Получение большего количества геномных последовательностей сделает управление и сравнение комплементарных последовательностей генов еще более сложным. Несмотря на наличие большого объема данных секвенирования АЧС, использование современных надежных технологий позволяет создать обширную базу данных, включающую полноразмерные геномные последовательности большого количества изолятов, которая



могла бы заменить современную, менее содержательную классификацию на основе генотипов: <https://virology.uvic.ca/organisms/dsdna-viruses/asfarviridae/>

3) библиотеки CRISPR/Cas9 или миРНК, мишенями которых являются геномы свиней.

Разработка библиотек для нокаута генов свиней имеет решающее значение для геномных скрининговых исследований ASFV *in vitro*. Библиотеки, мишенями которых является геном свиней, могли бы иметь большую ценность для выполнения геномных скрининговых исследований хозяев ASFV в рамках широкого спектра экспериментальных подходов, которые могли бы привести к открытию потенциальных рецепторов, а также путей метаболизма, подвергающихся модуляции с целью ускользания от обнаружения иммунной системой или увеличения вирулентности вируса.

4) Вирусные транскриптомные исследования

Современные технологии могли бы обеспечить относительно легкое получение данных об экспрессии гена ASFV на уровне РНК или белка в масштабах генома для определения различий в экспрессии генов ASFV *in vitro* и *in vivo* у различных хозяев.

### **ПАТОГЕНЕЗ**

Африканская чума свиней - вирусная инфекция домашних свиней, приводящая к нескольким формам заболевания, начиная от высоколетальных острых до субклинических проявлений в зависимости от факторов, связанных с вирусом и организмом хозяина (Tulman *et al.*, 2009). В Африке высоковирулентные вирусы вызывают широкий спектр реакций в популяциях свиней в эндемичных районах. На уровне стада или популяции инфекции могут приводить к сероконверсии у 50-100 процентов свиней при отсутствии признаков заболевания; при этом доля свиней, погибших от острой формы АЧС, различается. В отличие от домашних свиней, у диких африканских представителей семейства свиных, инфицированных ASFV, как правило, отсутствуют симптомы заболевания и регистрируются низкие значения титра виремии (Heuschele and Coggins 1969; Montgomery 1921; Plowright 1981; Thomson 1985). Эти особенности картины при АЧС и сходство клинической манифестации с другими заболеваниями свиней, например, рожи и классической чумы свиней, препятствуют надзору за синдромом у домашних свиней исключительно на основании клинических признаков.

Заражение обычно происходит воздушно-капельным путем с первичной репликацией вируса в миндалинах, сопровождающейся виремией; дальнейшая вторичная репликация происходит во всех органах гемолимфатической системы. При острой форме заболевания инкубационный период составляет от 5 до 15 дней. У пораженных животных отмечаются лихорадка и анорексия с последующим застоем и цианозом кожи, учащением дыхания и сердцебиения, выделениями из носа, рвотой и, наконец, кома и смерть. Кровотечение может клинически наблюдаться в различных формах и типах секретов, включая носовое кровотечение, мелену, кровь в кале и рвоту кровью. Продолжительность жизни животных, инфицированных африканскими штаммами АЧС, составляет от 2 до 9 дней (Conceicao 1949; Creig and Plowright 1970; Haresnape *et al.*, 1988; Mendes 1961; Thomson *et al.*, 1979; Howey *et al.*, 2013). Типичные клинические патологические явления при острой АЧС включают лейкопению (Detray and Scott 1957; Edwards *et al.*, 1985; Wardley and Wilkinson 1977), В и Т-клеточную лимфопению (Sánchez Vizcaino *et al.*, 1981; Wardley and Wilkinson 1980),



тромбоцитопению (Anderson *et al.*, 1987; Edwards 1983; Edwards *et al.*, 1985), апоптоз лимфоцитов и мононуклеарных клеток (Carrasco *et al.*, 1996; Gomez-Villamandos *et al.*, 1995; Oura *et al.*, 1998c; Ramiro-Ibañez *et al.*, 1996; Salguero *et al.*, 2004). Морфологические поражения могут включать кровоизлияния в лимфатические узлы, селезенку, почки, дыхательные пути и желудочно-кишечный тракт, гиперемиию кожи и серозных оболочек, выраженный междолевой отек легких и выпот из полостей тела, который может варьироваться от серозно-фибринозного до геморрагического (DeKock *et al.*, 1994; Detray 1963; Konno *et al.*, 1972; Manso Ribeiro and Rosa Azevedo 1961; Maurer *et al.*, 1958; Montgomery 1921; Nunes Petisca 1965; Steyn 1928 and 1932; Howey *et al.*, 2013). Обширный некроз в пораженных тканях и тяжелые гемостатические и гемодинамические изменения, вероятно, являются важными факторами, приводящими к смерти. Острая АЧС также вызывает значительные изменения в белках острой фазы (Carpintero *et al.*, 2007; Sanchez-Cordon *et al.*, 2007). Подострые случаи длятся 3-4 недели, и наиболее выраженные признаки включают перемежающуюся лихорадку, недомогание, пневмонию, одышку, сердечную недостаточность и отек суставов. Возможны кровоизлияния в лимфатические узлы и другие ткани, но они не так заметны, как при острой АЧС (Moulton and Coggins 1968a). Основными типами клеток, инфицируемыми ASFV, являются клетки, принадлежащие к мононуклеарно-фагоцитарной системе, в том числе фиксированные тканевые макрофаги и специфические линии ретикулярных клеток (Colgrove *et al.*, 1969; Konno *et al.*, 1971a и 1971b; Mebus 1988; Moulton and Coggins 1968a). После инфицирования высоковирулентными вирусными штаммами в пораженных тканях наблюдаются обширные повреждения. Умеренно вирулентные штаммы ASFV также, по-видимому, заражают клетки этих типов, однако степень вовлечения тканей и повреждение тканей в этом случае гораздо менее серьезны. Способность ASFV реплицироваться и вызывать выраженные цитопатологические изменения в макрофагах *in vivo* в многочисленных тканях свиньи (Howey *et al.*, 2013), по-видимому, является важнейшим фактором вирулентности ASFV.

Продемонстрировано длительное присутствие вируса после инфицирования свиней изолятами I генотипа с пониженной вирулентностью (Wilkinson 1984; Carrillo *et al.*, 1994). Показано, что эти стойкие инфекции могут передаваться от свиней, постоянно инфицированных изолятом NH/P68 I генотипа с низкой вирулентностью, контактирующим с ними свиньям (Gallardo *et al.* 2015). Изоляты с низкой вирулентностью могут вызывать хронические формы заболевания, характеризующиеся отсутствием типичных поражений острой фазы и низкой смертностью при часто встречающихся отчетливых клинических признаках, включая замедленный рост, истощение, отек суставов, кожные язвы и вторичные бактериальные инфекции (Sanchez-Vizcano 2015). Показано, что свиньи, пережившие инфекцию, несут вирус в тканях или крови в течение длительного времени, что может способствовать передаче вируса, сохранению заболевания в популяции, спорадическим вспышкам и внезапной реактивации заболевания (Costard *et al.* 2013; Gallardo *et al.*, 2015). Некоторые исследования в Африке выявили наличие нуклеиновой кислоты ASFV у внешне здоровых свиней (Kalenzi Atuhaire *et al.*, 2013; Thomas *et al.*, 2016), положительных по ASFV согласно ПЦР в тканях, но отрицательных при ПЦР в крови и серологическом анализе (Okoth *et al.* 2013; Abworo *et al.*, 2017). Имеется ограниченное количество экспериментальных данных о передаче инфекции от устойчиво инфицированных животных особям, ранее не контактировавшим с вирусом. Хотя

значимость устойчиво инфицированных животных как носителей АЧС в полевых условиях не ясна, идет накопление данных о здоровых и инфицированных животных (Titov *et al.* 2017, Abworo *et al.*, 2017, Thomas *et al.*, 2016, Muhangi *et al.*, 2015, Braae *et al.*, 2015, Athuaire *et al.*, 2013), что указывает на способность вирулентного вируса выживать в течение длительного времени в организме выздоровевших свиней и возможность рецидива вирулентности впоследствии (Titov *et al.*, 2017).

Сообщалось, что стойкая инфекция АЧС встречается у бородавочников и домашних свиней, переживших острую вирусную инфекцию (DeKock *et al.*, 1940; Detray 1957; Plowright *et al.*, 1969). В экспериментальных условиях долгосрочная стойкая инфекция является последствием инфекции ASFV (внутримышечное (в/м) введение E75-L7 в низких дозах, разовое введение E75-CV1 и двукратная стимуляция E75-L7, а также однократная стимуляция E75-CV1 с E75-L7 у домашних свиней (Carrillo *et al.*, 1994). У этих животных вирусную ДНК обнаруживали во фракции моноцитов периферической крови более чем через 500 дней после введения посредством ПЦР через нерегулярные промежутки времени; однако выделить инфекционный вирус из этих образцов и продемонстрировать его передачу не удалось. Последние данные, полученные с использованием умеренно вирулентных изолятов различных генотипов в течение более короткого периода времени (Petrov *et al.*, 2018), не подтверждают установление статуса носителя у животных, переживших инфекцию, хотя долгосрочное обнаружение вирусного генома в крови (в течение не менее чем 90 дней после введения) согласуется со многими другими сообщениями (McVicar 1984; Mebus and Dardiri, 1980; Carrillo *et al.*, 1994; Gallardo *et al.*, 2015; Carvalho Ferreira *et al.*, 2012).

В странах Африки к югу от Сахары ASFV сохраняется в энзоотическом цикле в организмах диких свиней (бородавочников) и клещей рода *Ornithodoros* (Plowright *et al.*, 1969a и 1969b; Thomson *et al.*, 1983; Wilkinson 1989). Тем не менее, другие дикие свиньи, например, кистеухие свиньи, не обитают в норах, и поэтому, скорее всего, распространяют ASFV посредством прямой передачи, хотя количество таких доказанных случаев ограничено (Jori and Bastos 2009; Jori *et al.* 2013). В отличие от домашних свиней, у диких свиней, инфицированных ASFV, как правило, симптомы заболевания отсутствуют, и имеет место низкий титр вирусии (Heuschele and Coggins 1969; Montgomery 1921; Plowright 1981; Thomson 1985). Большинство взрослых бородавочников в энзоотических по ASFV областях сероположительны и, вероятно, устойчиво инфицированы. У кистеухих свиней, как и у бородавочников, развивается субклиническая инфекция, и они более устойчивы к прямой контактной передаче, чем домашние свиньи; однако вирусия ASFV у них может быть продолжаться дольше (Anderson *et al.*, 1998). Хотя репликация ASFV в лейкоцитах крови домашней свиньи, бородавочника и кистеухой свиньи *in vitro* носит аналогичный характер, репликация и распространение вируса АЧС, а также индукция апоптоза лимфоцитов крови у кистеухих свиней *in vivo* ослаблены по сравнению с домашними свиньями (Anderson *et al.*, 1998; Oura *et al.*, 1998a and 1998b).

Выполнено исследование роли некоторых генов ASFV в вирулентности вируса. Становится все более очевидным, что концевые геномные области и гены мультигенного семейства (MGF) играют значительную роль в определении круга хозяев ASFV. Белки ASFV, вовлеченные в метаболизм нуклеотидов и нуклеиновых кислот, участвуют в определении



круга хозяев с точки зрения способности вируса к росту в макрофагах и, аналогично таким же белкам в других крупных ДНК-содержащих вирусах, могут образовывать пулы дезоксирибонуклеотидов, благоприятствующие эффективной репликации вируса в специфических типах клеток. Удаление генов дУТФазы (ген E165R) и тимидинкиназы (ген K196R) из ASFV снижает его способность к репликации в макрофагах и ослабляет вирус по отношению к свиньям, аналогично корреляции круга хозяев с точки зрения способности к росту в макрофагах с вирулентностью у свиней (Moore *et al.*, 1998).

В качестве альтернативы, несколько генов или областей генов ASFV связаны с вирусным патогенезом и вирулентностью по отношению к домашним свиньям, но не влияют на репликацию вируса в макрофагах *in vitro*. Два из них, UK (DP96R) и 23-NL (DP71L или I14L), расположены в геноме рядом друг с другом. UK, ранний белок, характеризуется достаточной изменчивостью у различных изолятов вируса, не обладает сходством с другими известными белками, и делеция UK из патогенного ASFV, не влияя на рост вируса в макрофагах *in vitro*, заметно ослабляет вирус по отношению к свиньям (Zsak *et al.*, 1998). Другой ген, 23-NL, кодирует белок NL, сходный с клеточным белком MyD116 и фактором нейровирулентности ICP34 вируса простого герпеса 5 (Sussman *et al.*, 1992; Zsak *et al.*, 1996). Делеция NL из штамма ASFV E70 ослабляет вирус по отношению к свиньям, не влияя на репликацию вируса в макрофагах *in vitro*.

Крупная делеция шести генов MGF360 и двух генов MGF530 значительно ослабляет репликацию вирусов в макрофагах (Neilan *et al.*, 2002). Недавно было показано, что эти делеции, естественным образом возникшие в процессе адаптации к росту в стандартных клеточных линиях (Krug *et al.*, 2015) или введенные посредством генетических манипуляций (O'Donnell *et al.*, 2015b; Reis *et al.*, 2016; Sanchez-Cordon *et al.*, 2016), тесно связаны с уменьшением вирулентности вируса в экспериментальных исследованиях инфекции у свиней. Вирулентные изоляты Georgia2007 (O'Donnell *et al.*, 2015b) и Benin (Reis *et al.*, 2016; Sanchez-Cordon *et al.*, 2016) стали полностью аттенуированными и могли вызывать надежную защиту при экспериментальном заражении гомологичным вирусом.

Кроме того, недавно охарактеризован новый ген DP148R (Reis *et al.*, 2017). Делеция этого гена, явным образом вовлеченного, аналогично генам MGF360/530, в модуляцию ответа интерферона, снижает вирулентность изолята Benin у свиней и индуцирует защиту от экспериментального заражения гомологичным вирусом.

Эти исследования внесли значительный вклад в углубление понимания молекулярных основ патогенеза ASFV и особой роли вирусных белков в исходе заболевания.

### **Недостаточно изученные аспекты**

Хронические формы характеризуются более низкой заболеваемостью и смертностью по сравнению с острыми и подострыми формами АЧС, при которых наблюдаются тяжелые воспалительные изменения, ответственные за интенсивное повреждение тканей и истощение лимфоидной ткани вызывающие гибель животных. Полезную информацию можно получить в ходе исследования патогенетических механизмов хронических форм, вызванных изолятами ASFV с низкой вирулентностью. Механизмы, ответственные за выживание животных при инфекции, в том числе механизмы, участвующие в защитном

иммунном ответе, ответственном за появление животных-носителей, недостаточно хорошо изучены.

Использование аттенуированных штаммов, полученных путем генетической манипуляции или адаптации к различным клеточным линиям, является ценным инструментом для изучения механизмов аттенуации. Сравнительный анализ поведения хозяина и вируса с использованием родительских вирулентных и производных ослабленных штаммов, особенно на ранних стадиях инфекции, мог бы позволить получить важные данные о механизмах со стороны хозяина и вируса, вызывающих ослабление вируса. Особый интерес представляют исследования, которые можно выполнить с использованием пар вирулентных/аттенуированных штаммов, отличающихся только одним геном, что позволяет устранять помехи из-за различий в генетическом фоне различных штаммов вирусов. Различия в картине репликации вируса, кинетике и тяжести проявления микро- и макропатологических явлений, а также закономерности активации генов хозяина следует анализировать с использованием свиней, инфицированных каждым из такой пары вирусов.

К значительным пробелам в базовых знаниях о патологии ASFV относятся:

- 1) основные механизмы, регулирующие передачу инфекции от животного к животному.
- 2) анализ различных аспектов в процессе взаимодействия хозяина и вируса, особенно при ранней (первичной) инфекции.
- 3) молекулярные различия в процессе патогенеза, индуцированного вирусами с различной степенью вирулентности
- 4) роль специфических геномных детерминант в исходе заболевания.

#### **Аспекты, нуждающиеся в исследовании**

- 1) Основные параметры, регулирующие передачу инфекции от хозяина к хозяину, включая домашних и диких свиней, а также хозяев-членистоногих.
- 2) Изучение патогенеза изолятов ASFV с различной вирулентностью у различных восприимчивых хозяев с целью выявления и, в конечном счете, подавления ранних проявлений инфекции.
- 3) Оценка скорости передачи штаммов ASFV различной вирулентности в экспериментах на инфицированных и контактирующих с ними животных.
- 4) Определение закономерностей активации иммунологически значимых генов хозяина, особенно на ранних стадиях после инфицирования.
- 5) Определение генов и генетических детерминант (групп генов, например, мультигенных семейств) ASFV, участвующих в определении круга хозяев, вирулентности и патогенности.

#### ***ИММУНОЛОГИЯ***

Основным препятствием на пути разработки безопасной и эффективной вакцины против АЧС является недостаток иммунологической информации. Попытки вакцинировать животных с помощью экстрактов инфицированных клеток, супернатантов инфицированных лейкоцитов периферической крови свиней, очищенных и



инактивированных вирионов, инфицированных макрофагов, фиксированных глутаральдегидом, или инфицированных альвеолярных макрофагов, обработанных детергентом, не смогли вызвать защитный иммунитет (Coggins 1974; Forman *et al.*, 1982; Kihm *et al.*, 1987; Mebus 1988). Гомологичный защитный иммунитет развивается у свиней, переживших вирусную инфекцию. У свиней, перенесших острую инфекцию умеренно вирулентными или аттенуированными вариантами ASFV, развивается долговременная резистентность к экспериментальному заражению гомологичным и, изредка - гетерологичным вирусом (Hamdy and Dardiri 1984; Ruiz-Gonzalvo *et al.*, 1981). Свиньи, иммунизированные живыми аттенуированными вирусами АЧС, несущими рекомбинантные делеции специфических генов вирулентности АЧС/диапазона хозяина, были защищены от гомологичного родительского вируса (Lewis *et al.*, 2000; Moore *et al.*, 1998; Zsak *et al.*, 1996 и 1998). Гуморальный и клеточный иммунитет являются важными компонентами защитного иммунного ответа на АЧС. Антител к ASFV достаточно для защиты свиней от смертельной инфекции ASFV (Hamdy and Dardiri 1984; Onisk *et al.*, 1994; Ruiz-Gonzalvo *et al.*, 1981). Хотя описаны нейтрализующие антитела к ASFV против белков p30, p54 и p72 вирионов (Vorca *et al.*, 1994a; Gomez-Puertas *et al.*, 1996; Zsak *et al.*, 1993), они не обеспечивают эффективной защиты, опосредованной антителами (Neilan *et al.*, 2004). По-видимому, CD8+ лимфоциты также играют роль в защитном иммунном ответе на инфекцию ASFV (Oura *et al.* 2005,).

ASFV, аналогично другим крупным ДНК-содержащим вирусам, влияет на иммунные реакции хозяина и модулирует их. Макрофаги, инфицированные ASFV, опосредуют изменения в иммунной функции клеток и, вероятно, играют роль в интенсивном апоптозе, наблюдаемом в лимфоидной ткани (Childerstone *et al.*, 1998; Oura *et al.*, 1998c; Ramiro-Ibañez *et al.*, 1996; Takamatsu *et al.*, 1999). ASFV ингибирует экспрессию провоспалительных цитокинов, например, ФНО- $\alpha$ , ИФН- $\alpha$  и ИЛ-8, индуцированную форболмиристиновыми кислотами, в то же время индуцируя продукцию ТФР- $\beta$  в инфицированных макрофагах (Powell *et al.*, 1996). И наоборот, сообщается об увеличении экспрессии ФНО- $\alpha$  после инфекции ASFV *in vitro* и *in vivo*, причем ФНО- $\alpha$  может играть ключевую роль в патогенезе ASFV, в том числе в изменениях проницаемости сосудов, свертывания крови, а также индукции апоптоза в неинфицированных лимфоцитах (Gomez del Moral *et al.*, 1999; Salguero *et al.*, 2002 и 2005). В частности, штаммы ASFV с различными фенотипами вирулентности различаются по способности индуцировать экспрессию провоспалительных цитокинов или генов, связанных с ИФН, в макрофагах на ранних стадиях инфекции (Afonso *et al.*, 2004; Gil *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2006). Белок ASFV pA238L (5EL), содержащий анкириновый повтор, является единственным известным вирусным гомологом клеточных белков I $\kappa$ B - цитоплазматических ингибиторов семейства клеточных факторов транскрипции NF $\kappa$ B/ Rel, и это считается важным фактором уклонения от иммунного ответа (Miskin *et al.*, 1998; Powell *et al.*, 1996). Активность pA238L лежит в основе нового механизма, позволяющего ASFV модулировать ответ клеток хозяина на инфекцию, в особенности учитывая роль NF $\kappa$ B-путей транскрипции в индукции экспрессии широкого диапазона провоспалительных и противовирусных медиаторов и цитокинов. В соответствии с этой ролью, pA238L может регулировать экспрессию циклооксигеназы-2 (ЦОГ-2), ФНО- $\alpha$  и индуцибельной синтазы оксида азота (iNOS). Подавление экспрессии ЦОГ-2 происходит независимо от NF $\kappa$ B, но в зависимости от NFAT (Granja *et al.*, 2004b). Аналогичным образом, pA238L ингибирует



экспрессию iNOS и, в конечном счете, продукцию оксида азота, посредством механизма, вероятно, включающего трансактивацию p300. Интересно, что делеция A238L из патогенного ASFV не влияет на рост вируса в макрофагах *in vitro* или вирусный патогенез и вирулентность по отношению к домашним свиньям (Neilan *et al.*, 1997b). Дополнительные белки, кодируемые ASFV, регулируют иммунный ответ хозяина или мешают ему. Белок ASFV 8DR (pEP402R) является единственным известным вирусным гомологом клеточного CD2 – белка Т-клеток, участвующего в совместной регуляции активации клеток (Vorca *et al.*, 1994b; Rodriguez *et al.*, 1993a). 8DR является необходимым и достаточным фактором опосредованной гемоадсорбции АЧС-инфицированными клетками (Vorca *et al.*, 1994b; Rodriguez *et al.*, 1993a). Делеция гена 8DR из генома ASFV привела к снижению ранней репликации вируса и генерализации инфекции у свиней; кроме того, белок 8DR подавлял клеточные иммунные реакции *in vitro* (Vorca *et al.*, 1998). Параллельные сравнительные тесты на основе гибридизации *in situ* показали, что делеция гомолога CD2 полностью устраняла репликацию вируса АЧС в тимусе (Vorca *et al.* 1998). Белок ASFV pEP153R (8CR) аналогичен белкам клеток и поксвирусов, напоминающим лектин-подобные белки типа С, в том числе мембраносвязанным иммуноактивируемым и иммунорегуляторным белкам CD69 и NKG2 (Neilan *et al.*, 1999; Yanez *et al.*, 1995). Потенциальная роль pEP153R в иммуномодуляции может быть неявной, однако pEP153R не влияет на вирусный патогенез и вирулентность по отношению к домашним свиньям (Neilan *et al.*, 1999). Кроме того, существуют доказательства, что ASFV оказывает сильное влияние на Th2/В-клеточный ответ, включая стимуляцию Th2-цитокинов растворимым фактором вирулентности (p36), высвобождаемым из моноцитов, инфицированных ASFV, и неспецифическую активацию и апоптоз, наблюдаемые в популяциях В-клеток у животных, инфицированных ASFV (Takamatsu *et al.* 1999; Vilanova *et al.*, 1999). Гены 360 и 530 мультигенного семейства ASFV участвуют в модуляции врожденного ответа у хозяина. В отличие от вируса дикого типа, инфекция макрофагов Pr4Δ35 - мутантным вирусом, у которого отсутствуют гены MGF360/530, приводила к увеличенному уровню мРНК нескольких генов раннего ответа I типа, индуцируемых интерфероном (Afonso *et al.*, 2004). Анализ уровней мРНК ИФН-α и секретируемого ИФН-α через 3, 8 и 24 часа после инфекции (п.и.) не выявил обнаружимого уровня ИФН-α в имитационных макрофагах и инфицированных макрофагах дикого типа, однако выявил значительно повышенный уровень ИФН-α через 24 часа п.и. в макрофагах, инфицированных Pr4Δ35, что указывает на способность генов MGF360/530 прямо или косвенно подавлять ответ I типа, индуцируемый ИФН. Этот эффект может лежать в основе дефектов роста Pr4Δ35 в макрофагах и его аттенуации у свиней (Zsak *et al.*, 2001).

В этой связи несколько сообщений подтверждают важность функции генов MGF в модуляции ответов ИФН и их значение для вирулентности вируса. Оригинальные эксперименты, выполненные Neilan *et al.*, 2002 и показавшие, что делеция генов MGF360/MGF530 ослабляет репликацию вируса в макрофагах, недавно были дополнены другими исследователями с целью демонстрации того, что эти делеции также тесно ассоциированы со снижением вирулентности вируса в исследованиях с экспериментальным заражением свиней (Krug *et al.*, 2015; O'Donnell *et al.*, 2015b; Reis *et al.*, 2016; Sanchez-Cordon *et al.*, 2016). Аналогичным образом, показано, что делеция недавно изученного гена DP148R, также участвующего в модуляции ответа, индуцируемого интерфероном, также снижает вирулентность изолята Benin у свиней (Reis *et al.*, 2017).



Кроме того, значительный прогресс достигнут при изучении иммуногенности белков ASFV у свиней. Например, в настоящее время имеется несколько сообщений с описанием клеточного и гуморального ответа, вызываемого индивидуально экспрессируемыми антигенами ASFV с использованием различных экспрессирующих векторов: вируса осповакцины (Lopera-Madrid *et al.*, 2017); ДНК-иммунизации (Argilaguuet *et al.*, 2012; Argilaguuet *et al.*, 2013; Lacasta *et al.*, 2014); аденовируса (Lokhandwala *et al.*, 2016; Lokhandwala *et al.*, 2017), или комбинации этих экспрессирующих векторов ( Jancovich *et al.*, 2018). В некоторых из этих сообщений описаны дальнейшие исследования - оценка способности этих вирусных белков вызывать защитный иммунный ответ у свиней (Argilaguuet *et al.*, 2012; Argilaguuet *et al.*, 2013; Lacasta *et al.*, 2014; Jancovich *et al.*, 2018). Однако на сегодняшний день в большинстве этих исследований продемонстрирована только такая защита, которая развивается не более чем у 50% исследуемых особей, что указывает на необходимость дальнейшей работы по выявлению вирусных антигенов, участвующих в индукции защитных иммунных реакций.

В заключение следует отметить, что в настоящее время накоплен значительный объем данных для изучения иммуногенности ряда белков ASFV. Важно отметить, что в некоторых случаях также выполнена оценка этих вирусных белков на предмет их способности индуцировать защитный иммунный ответ у свиней, что является первым шагом на пути потенциальной разработки субъединичной вакцины.

#### **Недостаточно изученные аспекты**

Попытки вызвать защитный иммунитет с помощью различных вакцинных платформ до сих пор не увенчались успехом. Гомологичный защитный иммунитет развивается у свиней, перенесших острую инфекцию умеренно вирулентными или экспериментально ослабленными вариантами ASFV. У этих животных развивается долгосрочная устойчивость к экспериментальному заражению гомологичным и, изредка - гетерологичным вирусом. Показано, что гуморальный и клеточный иммунитет являются значимыми компонентами защитного иммунного ответа на АЧС. Хотя описано, что нейтрализующие антитела против ASFV направлены против определенных вирусных белков, их недостаточно для антитело-опосредованной защиты. Кроме того, лимфоциты CD8<sup>+</sup> также, по-видимому, играют роль в защитном иммунном ответе на инфекцию ASFV. Таким образом, хотя в защите от данной инфекции участвуют гуморальный и клеточный иммунный ответ, фактический иммунный механизм или механизмы, опосредующие эту защиту, все еще неясны. Кроме того, большинство вирусных белков, индуцирующих эти механизмы иммунной защиты, все еще неизвестны. С другой стороны, показано, что белки ASFV влияют на иммунный ответ у хозяина и модулируют его *in vitro*.

Как указывалось выше, достигнуты успехи в выявлении и исследовании функции вирусных генов, модулирующих ответ у хозяина, и ее прямого воздействия в процессе инфицирования естественного хозяина. Кроме того, достигнут значительный прогресс в изучении иммуногенности многих ранее неизученных вирусных белков при введении их естественному хозяину. Некоторые из ключевых аспектов, недостаточно исследованных до настоящего момента, включают:

- 1) выявление иммунного механизма (механизмов), опосредующего защиту от инфекции у свиней, остается одним из основных вопросов, требующих ответа.
- 2) идентификацию вирусных белков, ответственных за индукцию защитного иммунного механизма.
- 3) понимание реальной роли иммуномодуляции у хозяина под влиянием вируса в процессе вирусной инфекции у свиней.
- 4) корреляция защиты от различных гетерологичных штаммов вируса остается неясной.

#### Механизмы защиты

В настоящее время существует крупный пробел в понимании механизмов защиты, индуцируемых экспериментальными вакцинами против ASFV. Несколько экспериментов с делецией одного или двух генов в геноме ASFV привели к появлению живых аттенуированных вакцин-кандидатов, однако механизмы защиты от АЧС с помощью этих вакцин в значительной степени неизвестны. Знания о конкретной роли отдельных белков ASFV в индукции защиты, за исключением простейшего прогнозирования их функции, отсутствуют. Клеточные и антитело-опосредованные механизмы, участвующие в защите, также в значительной степени не изучены. Кроме того, неизвестны механизмы персистенции вируса (или экспериментальной вакцины). Понимание этих механизмов важно во избежание персистенции живых аттенуированных вакцин в полевых условиях, а также для понимания и прогнозирования персистенции полевых изолятов с пониженной вирулентностью.

Клеточный иммунный ответ на ASFV или любую экспериментальную вакцину в значительной степени неизвестен, отчасти из-за отсутствия доступных знаний по иммунологии свиней. В настоящее время в значительной степени неизвестно, какие конкретные типы клеток участвуют в индукции иммунного ответа или какие типы клеток участвуют в индукции долгосрочной защиты от ASFV. На сегодняшний день обнаружено очень мало нейтрализующих или Т-клеточных эпитопов ASFV. Недавно установлено, что продукция нейтрализующих антител возможна при экспрессии р30, р54, р72, однако эти антитела не обеспечивали защиту против ASFV (Neilan *et al.*, 2004). Это говорит о необходимости более широкого понимания роли антител в защите или усилении заболевания, поскольку существует возможность вовлечения в патогенез продуцируемых антител, которые не являются нейтрализующими, с возможным подавлением распространения вируса. Кроме того, антитело-опосредованное ухудшение хода заболевания может быть обусловлено поглощением вируса макрофагами, опосредованным Fc-рецепторами. Понимание роли как антител против ASFV, так и иммунного ответа на ASFV может позволить получить новую информацию о различиях в вирулентности у различных изолятов АЧС, а также узнать, почему некоторые дикие африканские свиньи заражаются АЧС, однако клинические признаки заболевания у них не развиваются. Понимание этих механизмов защиты позволит получить более безопасные вакцины, включая возможность создания субъединичных вакцин.

Корреляция защиты от различных гетерологичных штаммов вируса

Механизмы перекрестной защиты от гетерологичных штаммов вируса в значительной степени не изучены, отчасти из-за отсутствия геномных последовательностей различных штаммов ASFV; таким образом, разнообразие ASFV исследовано в недостаточной степени. В целом в Африке, особенно в современных эндемичных районах, проводится очень мало исследований, связанных с полевыми штаммами. В Мозамбике серологически положительные свиньи были устойчивы по крайней мере к двум высоковирулентным вирусам II и VIII генотипов, которые не являлись близкородственными по отношению друг к другу, что свидетельствует о наличии перекрестной защиты в полевых условиях (Penrith *et al.*, 2004). Возможные страны для проведения перекрестных исследований в области защиты включают Уганду, Танзанию, Мозамбик и Кению. В этих странах использование эндемичных штаммов для экспериментальных вакцин может позволить проводить долгосрочные исследования вакцин с участием большого количества животных.

Понимание механизмов перекрестной защиты позволит улучшить вакцины следующего поколения для перекрестной защиты, а также прогнозировать, какую вакцину следует использовать при вспышках, вызванных новыми эмерджентными штаммами ASFV. Исследование специфических вирусных белков, участвующих в перекрестной защите, потребует больших усилий по секвенированию штаммов ASFV, циркулирующих в настоящее время, а также крупных исследований перекрестной защиты с использованием дивергентных штаммов.

#### **Аспекты, нуждающиеся в исследовании**

- 1) открытие иммунного механизма, опосредующего эффективную гомологичную и гетерологичную защиту от вирусной инфекции.
- 2) выявление вирусных генетических структур, коррелирующих с наличием/отсутствием гомологичной и гетерологичной защиты.
- 3) выявление вирусных белков, участвующих в индукции защитного иммунного ответа.
- 4) выявление регуляторных генов, участвующих в продукции провоспалительных цитокинов и антител, и оценка их фактической роли в вирусной инфекции\вирулентности у свиней.
- 5) изучение возможности разработки новых анализов на основе клеточного иммунитета для раннего выявления заболевания.
- 6) улучшение понимания роли мультигенных семейств в изменчивости антигенов и уклонении от иммунного ответа.
- 7) выявление и изучение генов, связанных с защитой у хозяина.

#### **ВАКЦИНЫ**

В настоящее время не существует коммерческой вакцины против ASFV, равно как и эффективной коммерческой вакцины против АЧС. Сводная информация об экспериментальных вакцинах против АЧС, представленных в рецензируемых научных публикациях 2012-2018 гг., приведена в таблице III. В экспериментах гомологичной защиты можно достичь путем введения свиньям изолятов с низкой вирулентностью, полученных путем культивирования в тканях или путем делеции генов, вовлеченных в механизмы вирулентности, а также полевых изолятов с низкой вирулентностью (Lewis *et al.*, 2000;



Leitao *et al.*, 2001; Voinas *et al.*, 2004). Обычно у этих животных развивается длительная устойчивость к экспериментальному заражению гомологичным и, изредка, гетерологичным вирусом (Hamdy and Dardiri 1984; Ruiz-Gonzalvo *et al.*, 1981). Это отсутствие перекрестной защиты против различных изолятов является важным вопросом, который следует рассматривать при разработке вакцин-кандидатов против АЧС.

В механизме защиты участвует клеточный иммунитет, так как элиминация CD8+ Т-клеток устраняет защиту (Oura *et al.*, 2005; Denyer *et al.* 2006,). Показана роль антител в защите, поскольку пассивный перенос антител иммунных свиней обеспечивает частичную защиту от летального заражения (Onisket *et al.*, 1994). В экспериментах с использованием рекомбинантных белков частичная защита достигалась с использованием комбинации двух белков - p54 и p30, а также рекомбинантного CD2-подобного белка (Ruiz-Gonzalvo *et al.*, 1996; Gomez-Puertas *et al.*, 1998). Однако другие исследователи не смогли повторить некоторые из этих результатов при использовании высоковирулентных изолятов ASFV (Neilan *et al.*, 2004). Невозможность обеспечения полной защиты в этих экспериментах могла быть обусловлена способом доставки антигенов и/или тем, что для обеспечения защиты требуется большее количество антигена или разные антигены. Альтернативным объяснением является, возможность достижения полной защиты только при использовании в качестве вакцин живых ослабленных вирусов АЧС, способных к репликации.

Свиньи, иммунизированные живыми ослабленными вирусами АЧС, содержащими рекомбинантные делеции специфических генов вирулентности/определения круга хозяев ASFV (см. обзор Dixon *et al.*, 2008 и Tulman *et al.*, 2009), были защищены от экспериментального заражения гомологичным исходным вирусом (Lewis *et al.*, 2000; Moore *et al.*, 1998; Zsak *et al.*, 1996 and 1998). Эта предварительная работа, в основном выполненная с использованием исторических штаммов вирусов, была недавно расширена за счет использования изолятов вируса, имеющих эпидемиологическое значение в настоящее время. Кроме того, в настоящее время выявлены новые гены в качестве дополнительных мишеней для делеций, приводящих к ослаблению вируса. Например, делеция 9GL, ранее описанная у изолята Malawi (Lewis *et al.*, 2000), была выполнена у изолята Georgia 2007 (O'Donnell *et al.*, 2015a), что привело к ослаблению вируса и позволило продемонстрировать возможность его использования в качестве экспериментальной вакцины для защиты от экспериментального заражения гомологичным вирусом. Другие генетические манипуляции, включая делецию группы генов MGF у изолята Georgia 2007 (O'Donnell *et al.*, 2015b) или Benin (Sanchez-Cordon *et al.*, 2018; Reis *et al.*, 2016) или делецию ранее неизученного гена DP148R (Reis *et al.*, 2017), приводили к аттенуации исходного вируса и защищали от экспериментального заражения вирулентным гомологичным вирусом.

Интересно, что в изоляте Georgia 2007 были впервые использованы сложные генетические манипуляции с делециями нескольких генов в одном и том же вирусе. Некоторые из этих попыток были изначально безуспешными - приводили к выраженной аттенуации, но не позволяли индуцировать защитный иммунный ответ (O'Donnell *et al.*, 2016a; Abrams *et al.*, 2013). И наоборот, в других случаях комбинированные делеции генов успешно повышали безопасность и иммуногенность вакцин, как в случае мутанта Georgia 2007 с делециями генов 9GL и UK (O'Donnell *et al.*, 2016b).



Одной из проблем, связанных с использованием вакцин против ASFV, является потенциальное генетическое разнообразие штаммов, циркулирующих в пределах одного географического региона. Несмотря на наличие неподтвержденной информации, свидетельствующей о наличии перекрестной защиты по отношению к вирусам, принадлежащим к различным генотипам, такая защита до недавнего времени не демонстрировалась в экспериментах. Удаление CD2-подобного гена из вирулентного изолята Badajoz71 привело к появлению ослабленного вируса, который обеспечил защиту не только против гомологичного исходного вируса, но и гетерологичных изолятов Spain75 и Armenia2010 (Monteagudo *et al.*, 2017). Интересно, что этот конкретный вирус обладает уникальной характеристикой роста в традиционной линии клеток, что имеет первостепенное значение для потенциального вакцинного штамма, который должен обеспечивать высокий титр при росте для производства вакцины. Поэтому, возможно, удастся разработать вакцины, которые смогут перекрестно защищать от инфекции, вызванной несколькими генотипами.

Выявление и изучение новых генов ASFV, участвующих в вирулентности и в уклонении от иммунного ответа хозяина, по-прежнему является необходимым для облегчения и улучшения разработки рационально ослабленных вакцин путем последовательной делеции/модификации этих генов. Несмотря на необходимость дальнейших исследований, разработка эффективных вакцин сейчас представляется более реалистичной задачей, чем несколько лет назад.

Существенный прогресс в области альтернативных подходов к исследованию субъединичных вакцин на основе экспрессии протективных антигенов отсутствует из-за недостатка исследований, посвященных выявлению вирусных антигенов, индуцирующих защиту. Недавняя разработка высокопроизводительных методов конструирования рекомбинантных вирусных векторов открывает путь к глобальному анализу защитного потенциала всех генов, экспрессируемых ASFV. В этой связи в нескольких сообщениях описано исследование клеточного и гуморального ответа, вызванного антигенами вируса АЧС, по отдельности экспрессируемыми в различных экспрессирующих векторах. Так, вирус осповакцины (Lopera-Madrid *et al.*, 2017), ДНК-иммунизацию (Argilaguet *et al.*, 2012; Argilaguet *et al.*, 2013; Lacasta *et al.*, 2014), аденовирус (Lokhandwala *et al.*, 2016; Lokhandwala *et al.*, 2017) или их комбинацию (Jancovich *et al.*, 2018) использовали для иммунизации свиней несколькими различными вирусными белками, отобранными по различным критериям. Некоторые из сообщений ограничиваются характеристикой иммунного ответа, вызываемого каждым из вирусных антигенов, экспрессированных в различных векторах (Lokhandwala *et al.*, 2016; Lopera-Madrid *et al.*, 2017; Lokhandwala *et al.*, 2017), без оценки защитного эффекта иммунизации при экспериментальном заражении свиней вирулентным вирусом. В тех сообщениях, которые включали исследования экспериментального заражения (Argilaguet *et al.*, 2012; Argilaguet *et al.*, 2013; Lacasta *et al.*, 2014; Jancovich *et al.*, 2018), защита развивалась не более чем у 50% исследуемых животных. Полученные результаты свидетельствуют о необходимости дальнейшей работы по расширенному выявлению вирусных антигенов, участвующих в индукции защитного иммунного ответа. Для успешного использования платформ для субъединичных вакцин в будущем может потребоваться оптимизация протоколов иммунизации, в том числе выбор эффективного

вакцинного вектора. Важно отметить, что сообщалось об успешной иммунизации с использованием вируса осповакцины и аденовируса в качестве векторов, экспрессирующих восемь неуказанных специфических вирусных белков, которая позволила защитить 100% иммунизированных свиней от экспериментального заражения вирулентным изолятом Benin (Netherton *et al.*, 2018). В настоящее время это - единственное сообщение, в котором представлена субъединичная вакцина против ASFV с полной защитной эффективностью.

### **Недостаточно изученные аспекты**

Хотя живые аттенуированные вирусные вакцины представляются наиболее перспективными, одной из основных проблем является их безопасность. Понятие о безопасной вакцине может зависеть от региона, в котором предполагается ее применение; например, использование вакцины с основой, идентичной ASFV, циркулирующему в эндемичном регионе или во время вспышки, сильно отличается от использования вакцины в благополучном регионе. В настоящее время не существует вакцины с маркером для дифференциации инфицированных и вакцинированных животных (DIVA).

На данный момент отсутствуют клеточные линии, прошедшие валидацию на предмет поддержания производства вакцин, что представляет собой еще один важный пробел в исследованиях вакцин против ASFV. Без такой клеточной линии коммерциализация вакцины против ASFV невозможна. Единственными зарегистрированными клетками, поддерживающими живую аттенуированную вакцину, являются первичные макрофаги свиньи, которые коммерчески нецелесообразно использовать для крупномасштабного производства вакцины.

Некоторые из ключевых пробелов в исследованиях, препятствующие разработке безопасных и эффективных вакцин против АЧС, и, в частности, вакцин, разработанных для целей контроля и ликвидации заболевания, включают:

- 1) Детерминанты вирулентности ASFV еще не выявлены и не изучены в полной мере, что ограничивает разработку рационально аттенуированных вакцинных штаммов.
- 2) Отсутствует иммортализованная клеточная линия для производства вакцины против вируса АЧС.
- 3) Продукты генов вируса АЧС, которые могут вызывать защитный иммунный ответ, для разработки субъединичных вакцин.
- 4) Механизмы защитного иммунитета.
- 5) Антигенное разнообразие различных штаммов вируса АЧС и его влияние на перекрестную защиту от гетерологичных штаммов, обеспечиваемую вакциной.
- 6) Выявление антигенных маркеров для разработки вакцины с отрицательными маркерами для дифференциации инфицированных и вакцинированных животных (DIVA).

### **Аспекты, нуждающиеся в исследовании**

- 1) Исследования в области вирусологии и функциональной геномики ASFV для определения мишеней, которые будут использоваться в исследованиях по разработке

вакцин, включая новые детерминанты вирулентности в геноме ASFV, антигены-мишени, необходимые для иммунитета, и механизмы уклонения от иммунного ответа.

- 2) Определение характеристик безопасности, ассоциированных с экспериментальными живыми аттенуированными вакцинами.
- 3) Разработка стабильной клеточной линии для производства вакцин, способной обеспечить устойчивый рост ASFV с возможностью масштабирования для коммерческого производства вакцин.
- 4) Разработка дополнительных рекомбинантных ASFV с делециями генов в качестве потенциальных вакцин-кандидатов, включая добавление маркеров DIVA.

### **ДИАГНОСТИКА**

Существует широкий спектр лабораторных методов обнаружения вируса АЧС и антител, и рекомендуемым подходом к обнаружению ASFV является их комбинация. Важно отметить, что у АЧС есть три существенных преимущества для обнаружения: i) вирус начинает обнаруживаться обычно через 2-3 дня после инфицирования и сохраняется в течение нескольких недель; ii) высокий уровень специфических антител обнаруживается в крови с 8-15-го дня после заражения и сохраняется в течение длительного времени, до нескольких лет; iii) поскольку вакцины не существует, специфические антитела (если они появляются до смерти животного) являются очень хорошим маркером инфекции. Однако пероральные и внутримышечные экспериментальные заражения поросят, молодняка и взрослых диких кабанов умеренно вирулентными изолятами приводили к острым формам АЧС со 100% летальностью в течение менее чем 12 дней, без обнаружения антител в сыворотке крови или эффективной передачи домашним контактным свиньям и диким кабанам (Gabriel *et al.*, 2011; Blome *et al.*, 2012). В экспериментальных условиях после заражения умеренно вирулентным изолятом вируса АЧС более старые свиньи, по-видимому, характеризовались лучшей выживаемостью по сравнению с молодыми свиньями, независимо от дозы прививки (Post *et al.*, 2017).

Присутствие специфических антител IgG к АЧС в течение длительного времени у инфицированных свиней обеспечивает первичную стратегию обнаружения острых и хронических форм АЧС, что имеет важное значение для программ ликвидации АЧС. Для обнаружения антител против АЧС применяют несколько методов, но наиболее распространенным, практичным и недорогим тестом является твердофазный иммуноферментный анализ (твердофазный ИФА); в качестве подтверждающих тестов используют: иммуноблоттинг (ИБ); реакцию непрямой иммунофлуоресценции антител (РНИФ); и иммунопероксидазный тест (ИПТ). Образцы, которые следует собирать для лабораторной диагностики АЧС, представляют собой: цельную кровь, соскобы и/или мазки с миндалин живых животных с подозрением на заболевание, а также лимфатические узлы, почки, селезенку, легкие, кровь и сыворотку павших свиней. Ткани, используемые для выделения вируса (РГАд), обнаружения вирусного антигена (ПИФ) и обнаружения вирусной ДНК (ПЦР), кровь, соскобы с миндалин используются только для выделения вируса и обнаружения вирусной ДНК. Сыворотку используют для обнаружения антител методом РНИФ, твердофазного ИФА или ИБ. Тканевые экссудаты можно использовать для

обнаружения вируса методом ПЦР и для выявления антител серологическими тестами, перечисленными выше.

Наиболее часто используемыми методами обнаружения и идентификации вирусов являются реакция гемадсорбции (РГАд), прямая иммунофлуоресценция (ПИФ), а с 2000 года - молекулярное обнаружение вируса АЧС методом ПЦР. В то время как РГАд и ПИФ-тесты отсутствуют в продаже, в настоящее время на рынке имеются несколько тест-систем на основе ПЦР, лицензированных в европейских странах (например, в Германии есть пять лицензированных комплектов для обнаружения ASFV от международных компаний, и еще два теста в настоящее время находятся в процессе валидации). Показано, что эти тесты являются очень надежными, специфичными и чувствительными. Примером может служить ПЦР, который включает все высушенные реагенты, а также буфер для разведения и положительный контроль (Zsak *et al.*, 2005). Важным необходимым компонентом для надежного анализа является внутренний контроль.

### **Методы обнаружения вируса**

Обнаружение и выделение вируса.

Реакция гемадсорбции (РГАд) имеет решающее значение для выявления вируса АЧС из-за ее чувствительности и специфичности. РГАд основана на гемадсорбционных свойствах, которые индуцируют большинство изолятов вируса АЧС при заражении макрофагов свиньи в присутствии эритроцитов свиньи. Перед появлением цитопатического эффекта развивается характерная розетка вокруг инфицированных макрофагов. Важно отметить, что небольшое количество полевых штаммов проявляют только цитопатический эффект, не вызывая явления гемадсорбции. Эти штаммы выявляют с помощью ПЦР и/или РПИФ в осадках этих клеточных культур.

Обнаружение ДНК вируса АЧС.

С 2000 года разрабатываются лабораторные ПЦР-тесты, основанные на обычной ПЦР и ПЦР в реальном времени, и некоторые из них уже прошли валидацию (ОИЕ, 2000; Agüero *et al.*, 2003; King *et al.*, 2003; Zsak *et al.*, 2005). При этих методах используют пары праймеров, отобранные из высококонсервативной области вирусной ДНК в области генома VP72, позволяющие обнаруживать широкий спектр изолятов АЧС, принадлежащих ко всем известным генотипам вируса. Это - эффективный и относительно быстрый метод, который должен быть включен в эпидемиологический надзор и диагностику АЧС. Существуют также полностью прошедшие валидацию коммерческие наборы и внутренние протоколы, мишенями для которых являются альтернативные регионы генома (их можно применять для исключения загрязнения ампликонами). Наборы, имеющиеся в продаже и лицензированные по крайней мере в одной стране, включают: INgene q PPA (Ingenasa), virotype ASFV (Indikal Bioscience), ID Gene ASF Duplex (IDvet) и RealPCR ASFV (IDEXX). На уровне референтной лаборатории ЕС, а также некоторых национальных референтных лабораторий выполнялись сравнительные испытания, результаты которых должны быть опубликованы в ближайшее время.

Прямая иммунофлуоресценция (ПИФ).

ПИФ-анализ основан на демонстрации вирусного антигена на импрессионных мазках или замороженном срезе тканей с конъюгированным иммуноглобулином против вируса АЧС.



Это - очень быстрый (один час) и экономичный тест с высокой чувствительностью к острой форме АЧС. Чувствительность теста ПИФ для подострых или хронических форм составляет лишь 40 %. Такое снижение чувствительности, по-видимому, связано с образованием комплексов антиген-антитело, которые не допускают реакции с конъюгатом АЧС.

Кроме того, существует специфический коммерческий метод обнаружения вирусного антигена Ag-ELISA на основе твердофазного ИФА. Оба метода обнаружения антигенов - ПИФ и Ag-ELISA - демонстрируют очень низкую чувствительность при хронических формах заболевания, при которых присутствуют комплексы антиген-антитело. Эти методы рекомендованы только для диагностики острых форм заболевания. Методы выявления антигенов не рекомендованы при хронических формах заболевания, в эндемичных зонах или для индивидуальной диагностики заболевания.

#### Дополнительные тесты.

В последние годы для диагностики АЧС был адаптирован ряд диагностических платформ, большинство из которых основаны на обнаружении ДНК в рамках мультиплексных методов (Lung *et al.*, 2018, Xiao *et al.*, 2018, Erickson *et al.*, 2018, Hu *et al.*, 2015, Shi *et al.*, 2016, Sastre *et al.*, 2016) или одиночного обнаружения и включают портативные системы ПЦР (Liu *et al.*, 2017), иммунохроматографические устройства для обнаружения антигенов (Sastre *et al.*, 2016) и новые платформы, например, использование биосенсоров (Mujibi *et al.*, 2018), капельную цифровую ПЦР (ddPCR) (Wu *et al.*, 2018), рекомбиназно-полимеразную амплификацию (RPA) (Wang *et al.*, 2017), полимеразную реакцию с использованием спиральных и перекрестно-связывающих праймеров (PCLSR) (Wozniakowski *et al.*, 2017), изотермическую амплификацию с перекрестно реагирующими праймерами (CPA) (Fraczyk *et al.*, 2016), причем для получения результата некоторым из них требуется всего 10 минут, а чувствительность и специфичность соответствует ПЦР с UPL, рекомендованной МЭБ.

#### **Методы обнаружения антител**

Твердофазный ИФА для обнаружения антител.

Этот метод наиболее пригоден для крупномасштабных серологических исследований. В настоящее время широко используются не менее трех коммерческих наборов для твердофазного ИФА (производства Ingenasa, Svanova, и IDVet). Недавно прошел валидацию еще один набор для твердофазного ИФА, и показано, что он дает надежные результаты (IDVet, на основе белка р32). Другие наборы для твердофазного ИФА разработаны для внутреннего пользования или находятся на стадии разработки и валидации; у всех них есть свои сильные и слабые стороны, которые следует учитывать при тестировании образцов сомнительного или плохого качества. Эти тесты основаны на обнаружении антител против АЧС, связанных с вирусными белками, которые присоединены к твердой фазе посредством добавления белка А, конъюгированного с ферментом, катализирующим визуально обнаруживаемую цветную реакцию при взаимодействии с соответствующим субстратом. Имеется коммерческий набор для обнаружения антител посредством твердофазного ИФА (INgezim PPA Compact Ingenasa), прошедший валидацию в центральной референтной лаборатории (CRL), Испания. Кроме того, CRL может по запросу предоставить «внутренний» твердофазный ИФА МЭБ, а также



стандартизованный/прошедший валидацию растворимый антиген для теста МЭБ на основе твердофазного ИФА.

Иммуноблоттинг (ИБ).

Это - высокоспецифичный, чувствительный и простой в интерпретации метод, который успешно используется в качестве метода, альтернативного РНИФ, рекомендованного в качестве подтверждающего теста при положительных или сомнительных результатах твердофазного ИФА. Наборы для ИБ отсутствуют в продаже, и стандартизованные/прошедшие валидацию стрипы антигенов для ИБ следует изготавливать своими силами. Их может предоставить CRL по заявке. Однако из-за сложности производства стрипов антигенов для ИБ годовой объем такого производства ограничен.

Тест на основе реакции непрямой иммунофлуоресценции антител (РНИФ).

РНИФ - это быстрый метод обнаружения антител к АЧС в сыворотке или экссудатах ткани, характеризующийся высокой чувствительностью и специфичностью. Он основан на обнаружении антител к АЧС, которые связываются с монослоем клеток (клетки Vero или MS), инфицированных адаптированным вирусом АЧС. Реакцию антитело-антиген обнаруживают за счет белка, меченого флуоресцеином А.

Иммунопероксидазный тест (ИПТ). ИПТ – иммуноцитохимический метод на фиксированных инфицированных клетках, позволяющий определять образование комплекса антиген- антитело с помощью фермента пероксидазы. В этой процедуре клетки Vero или MS инфицируют изолятами ASFV, адаптированными к этим культурам клеток. Инфицированные клетки фиксируют и используют в качестве антигенов для определения наличия специфических антител против АЧС в образцах сыворотки крови (Gallardo *et al.*, 2015).

Экспресс-тесты для раннего выявления антигена, выполняемые сразу после отбора материала. Недавно Carrai *et al.*, (2017) сообщили об использовании и валидации коммерческого серологического экспресс-теста в Сардинии, Италия. Используемый тест являет собой иммунохроматографическое устройство производства Ingenasa (INgezim PPA CROM). Исследование на добытых кабанах показало 82 % чувствительность и 96 % специфичность в полевых условиях (и лучшие показатели в лабораторных условиях). Продемонстрировано, что использование экспресс-тестов является менее дорогостоящим и трудоемким, обеспечивая при этом быстрое получение результатов. Таким образом, при определенных условиях можно рассматривать возможность применения этих тестов.

Использование комбинации вирусологических методов обнаружения (рекомендуется использовать ПЦР-тест, поскольку методы обнаружения антигенов, например, ПИФ и твердофазный ИФА антигена обладают крайне ограниченной чувствительностью в хронических случаях) одновременно с использованием серологических тестов (твердофазным ИФА и подтверждением положительных и сомнительных результатов посредством ИПТ/РНИФ или ИБ), позволяет выявлять все эпидемиологические ситуации АЧС (острые, подострые и хронические случаи) за очень короткое время с высокой точностью и достоверностью.



Оценку характеристик изолятов АЧС осуществляют по стандартизованному протоколу международного образца, установленному региональной лабораторией ЕС путем генотипирования. Стратегия генотипирования предполагает секвенирование трех независимых областей в геноме ASFV: 1) С-конца гена, кодирующего VP72; б) полное секвенирование гена VP54; и III) вариабельной области в пределах генома вируса АЧС под названием CVR (центральная вариабельная область), характеризующегося наличием последовательностей тандемных повторов (TRS). Частичное секвенирование VP72 и полное секвенирование VP54 позволяет помещать изоляты вируса АЧС в основные подгруппы до анализа CVR для раскрытия внутригенотипических отношений вирусов, вызывающих вспышки АЧС. Этот метод позволил получить дополнительную информацию о штаммах вируса, циркулирующих в Европе, Америке и Африке в течение 45 лет. Кроме того, эти методы позволили определить генетические связи и происхождение вирусов, ответственных за вспышки заболеваний, произошедшие в последние годы в Европе (Италии и странах Кавказа) и Африке.

### **Последние достижения в развитии диагностики АЧС**

Достижения в области обнаружения возбудителя.

Недавно выполнено исследование для сравнения имеющихся диагностических тест-систем в ходе текущей вспышки в Восточной Европе (Gallardo *et al.*, 2015). В этом исследовании наиболее чувствительным методом являлась ПЦР с использованием универсальной библиотеки зондов (UPL) (Fernandez-Pinero *et al.*, 2013; Gallardo *et al.*, 2015); следующими по чувствительности методами являлись ПЦР в реальном времени, предписываемая МЭБ (King *et al.*, 2003), и обычная ПЦР. В целом, согласованность между методами была от посредственной до хорошей (94% между UPL и ПЦР в реальном времени; 88% между UPL и обычной ПЦР). Коммерческий твердофазный ИФА антигена (INgezim PPA DAS K2; Ingenasa) продемонстрировал примерно 77% чувствительность.

Изотермические методы амплификации могут помочь при постановке диагноза в условиях простой лаборатории или даже полевых условиях, и исследовались в последние годы. Изотермические методы, опробованные для анализа вируса АЧС, включают амплификацию с перекрестно реагирующими праймерами (мишенью которых является ген p72). Fraczyk *et al.*, (2016) смогли продемонстрировать, что данный метод является столь же чувствительным, как и ПЦР с UPL, по крайней мере в выбранных условиях. Аналогичные результаты были получены для петлевой изотермической амплификации (LAMP), мишенью которой являлся ген топоизомеразы II. Помимо стандартных настроек, продемонстрирована визуализация с использованием ампликонов, дважды меченых биотином и флуоресцеином, на иммунохроматографических устройствах James *et al.*, 2010). Кроме других изотермических методов, например, RPA, за последние годы протестированы различные ПЦР-аппараты для полевого применения. Однако эти методы нуждаются в дальнейшей оценке.

**Достижения в области обнаружении антител.**

Недавно испытано пять серологических методов для обнаружения антител против АЧС, включая три коммерческих набора для твердофазного ИФА (производства Ingenasa, IDVet и Boehringer Ingelheim Svanova), твердофазный ИФА МЭБ и подтверждающий



иммунопероксидазный тест (ИПТ). Показано, что ИПТ являлся наиболее чувствительным методом, который также позволял исследовать тканевые экссудаты (Gallardo *et al.*, 2015). ИПТ мог обнаруживать антитела против АЧС на более ранней стадии серологического ответа, когда антитела присутствовали в небольшом количестве.

В целом, получены и сопоставлены знания по подходящим антигенам и их экспрессии для серодиагностики АЧС. Оценка имеющихся данных также выявила сильные и слабые стороны с точки зрения широкого диапазона обнаружения (Perez-Filgueira *et al.*, 2006; Cubillos *et al.*, 2013). Что касается африканских условий, то было продемонстрировано, что рекомбинантный белок р30 Moraga/Georgia способен отражать общую ситуацию. Эти данные используются (см. твердофазный ИФА Svanovir и IDScreen) и будут использованы при разработке новых тест-систем раннего и надежного обнаружения антител против АЧС. В настоящее время в повседневной практике используются по крайней мере три коммерческих набора для твердофазного ИФА (производства Ingenasa, Svanova и IDVet), а другие наборы находятся на стадии разработки и валидации. Все эти тесты имеют различные сильные и слабые стороны, особенно, когда речь идет об анализе низкокачественных сывороток кабанов. Кроме того, показано, что результаты варьируются в зависимости от лаборатории.

Последние разработки в области испытаний экспресс-тестов и альтернативных схем пробоотбора и анализа.

Наряду с одиночным ИХТ для обнаружения антител против АЧС, сообщалось о методе мультиплексного анализа вирусов АЧС и КЧС, который мог бы облегчить эпиднадзор за обоими заболеваниями (INgezim ASFV-CSFV-CROMAb) (Sastre *et al.*, 2016a).

На последнем совещании ASF-STOP в Пулави были представлены данные о том, что иммунохроматографические устройства также можно использовать в сочетании с мазками крови (Carlson *et al.*, подано в печать)

Описан ИХТ для обнаружения антигена вируса (INgezim ASFV-CROM) (Sastre *et al.*, 2016b). Данный анализ продемонстрировал чувствительность, сопоставимую с твердофазным ИФА антигена и в общем случае позволял обнаруживать вирусную нагрузку  $>10^4$  ГАЕ. Таким образом, больные животные или животные, павшие от АЧС, должны быть положительными при этом тесте (в большинстве случаев). В сочетании с другими методами этот инструмент может способствовать быстрому обнаружению заболевания в отдаленных или других проблемных районах (например, при анализе туш диких кабанов, не подлежащих перевозке), но, как указывалось выше, он обладает весьма ограниченной чувствительностью.

Неинвазивные стратегии пробоотбора могут означать оптимизацию надзора в дикой природе путем обхода схем пробоотбора при охоте/отлова, которые сопряжены с систематической ошибкой, связанной с физическим состоянием животных, и в худшем случае могут способствовать дальнейшему распространению вируса. В последнее время выполнялась оценка различных подходов к прижизненному пробоотбору как в экспериментальных, так и в полевых условиях.

Одним из вариантов неинвазивного подхода может быть сбор фекалий из среды обитания диких кабанов. В соответствии с этим, de Carvalho Ferreira *et al.*, (2014) проверили



пригодность образцов фекалий. Они показали, что в фекалиях вирус может обнаруживаться в 50-80% случаев по сравнению с обнаружением вирусов в крови. Для подострой/хронической фазы этот процент снижается и составляет менее 10%. Несмотря на эту довольно сильную изменчивость обнаружения в ходе заболевания, доказано, что ДНК ASFV достаточно устойчива в фекалиях (период полужизни более двух лет при 12°C или ~15 дней при 30°C, соответственно) и, таким образом, анализ фекалий может дополнить инструментарий методов мониторинга. Помимо обнаружения генома, недавно показано, что фекалии могут также быть пригодны для обнаружения специфических антител против АЧС (Nieto-Pelegrín *et al.*, 2015).

Другим вариантом является использование веревок (приманок) для сбора слюны. Было показано, что слюна пригодна для обнаружения антител (Murr *et al.*, 2013; Giménez-Lirola *et al.*, 2016) и генома (Grau *et al.*, 2015).

Опубликованные исследования по использованию веревочных приманок относятся в основном к КЧС (Mouchantat *et al.*, 2014; Dietze *et al.*, 2017) и ящур (Mouchantat *et al.*, 2014), однако аналогичные подходы применялись и для АЧС как в полевых, так и в лабораторных условиях. В России веревки оставляли в местах кормления, и показано, что кабаны их жевали.

Braae *et al.*, (2013) исследовали возможность использования карточек ФТА для сбора крови и последующего анализа посредством количественной ПЦР в полевых условиях в Танзании. Продемонстрировано обнаружение вирусной ДНК в подгруппе клинически здоровых животных; кроме того, этот принцип был подтвержден в лабораторных условиях.

Эти результаты соответствуют работе, опубликованной Randriamparany *et al.*, (2016) и Michaud *et al.*, (2007). В этих работах диагностику (и исследование) ASFV успешно выполняли при использовании фильтровальной бумаги с высушенной кровью (экспериментальные и полевые образцы) на протяжении длительного времени. Эти подходы обеспечивают пригодность и стабильность образца для последующего применения без сложной транспортировки и использования холодильной цепи, особенно в условиях тропиков. Randriamparany *et al.*, (2016) дополнительно продемонстрировали пригодность этого подхода для обнаружения антител. Исследование показало, что ПЦР в реальном времени с использованием UPL и образцов с фильтровальной бумаги так же чувствительна, как и общепринятый анализ с выделением вируса и традиционной ПЦР, а твердофазный ИФА с использованием образцов с фильтровальной бумаги соответствовал аналогичному исследованию образцов сыворотки. Проблемы со специфичностью отсутствовали.

Аналогично вышеупомянутому использованию карточек ФТА и фильтровальной бумаги, Petrov *et al.* (2014) показали, что тампон-зонды с высохшей кровью (в общем случае использовали различные тампон-зонды на основе ваты, пенопласта или ткани) могут представлять собой эффективный, стабильный и удобный метод исследования туш на предмет наличия геномов ASFV и CSFV. Преимущество этого подхода в том, что тампон-зонд уже вложен в подходящую емкость для транспортировки, и исключает непосредственный контакт и необходимость использования другого оборудования. В указанных исследованиях оптимальным вариантом с точки зрения удобства и устойчивости

являлись так называемые Genotubes (Thermofisher). В последующих исследованиях обоснованности концепции продемонстрирована пригодность этих образцов для обнаружения антител к вирусу АЧС методом твердофазного ИФА (в протоколе, подразумевающем использование дырокола для фильтровальной бумаги) (Blome *et al.*, 2014).

Недавно эти исходные данные были дополнены более широким валидационным исследованием, которое также включало комбинацию с иммунохроматографическими устройствами для обнаружения антител (Carlson *et al.*, представлено в печать). Указанное исследование продемонстрировало следующие эксплуатационные характеристики образцов на основе Genotube (по сравнению с обычными диагностическими образцами и тестами): количественная ПЦР - 98,8% чувствительность [ДИ 93,4, 100,0] и 98,1% специфичность [ДИ 90,1, 100,0] в лабораторных условиях (85,7% [ДИ 71,5, 99,6] при использовании хранящихся полевых образцов); серологические исследования методом твердофазного ИФА: 93,1% чувствительность [ДИ 83,3, 98,1] и 100% специфичность [ДИ 95,9, 100,0]. Обнаружено хорошее совпадение с результатами вышеуказанных ИХТ для обнаружения антител производства Ingenasa. Эта концепция особенно интересна, так как продемонстрировано практическое отсутствие проблем с плохим качеством образцов.

Ballester *et al.*, (2015) описали оптимизированный протокол гибридизации *in situ* для обнаружения ДНК вируса африканской чумы свиней в фиксированных формалином и залитых в парафин тканях с использованием зондов, меченых дигоксигенином, для исследований патогенеза и иммунного ответа (коррелятов защиты и распространения вируса в исследованиях вакцинации/экспериментального заражения), а также патологоанатомической диагностики.

## Генотипирование

Для получения новых знаний в области молекулярной эпидемиологии недавних вспышек проводятся дополнительные исследования геномных маркеров, в том числе различных межгенных областей. При секвенировании нового поколения в качестве вспомогательного метода можно использовать обогащение за счет технологии целевого захвата последовательностей (Fernández Pinero, неопубликованные данные).

## Заключение

В заключение следует отметить, что инструментарий диагностических тестов значительно вырос за последние годы, однако по-прежнему существует потребность в гармонизированных, адаптированных к ситуации диагностических рабочих процессах и общих знаниях в области биологии заболевания, которые будут способствовать дальнейшей корректировке методологии. Необходимы оптимизированные и гармонизированные рабочие процессы для секвенирования нового поколения. Вместе с тем, важно отметить, что в последние годы область диагностики расширилась и включает поиск новых моделей обнаружения. Это подразумевает не только использование текущих методов с новыми видами образцов, например, фекалиями (de Carvalho Ferreira *et al.*, 2014; Nieto-Pelegrin *et al.*, 2015), карточками ФТА (Braae *et al.*, 2013), тампон-зондами с высушенной кровью (Petrov *et al.*, 2014; Blome *et al.*, 2014) и слюны (Mur *et al.*, 2013; Grau *et al.*, 2015; Gimenez-Lirola *et al.*, 2016), но и поиск новых моделей, например, образцов



воздуха (de Carvalho Ferreira *et al.*, 2013) и корма (Dee *et al.*, 2018). Это направление способствует разработке более экологичных и менее инвазивных диагностических средств, соответствующих потребностям в данной области.

### **Недостаточно изученные аспекты**

Подозрение на АЧС обычно возникает на основе клинических признаков, но клинические данные, как правило, являются неспецифическими, и их трудно дифференцировать от других заболеваний свиней, в том числе классической чумы свиней, рожи, сальмонеллеза, эшеритриоза, пастереллеза, болезни Ауески, тромбоцитопенической пурпуры, отравления варфарином и солями тяжелых металлов. Региональные лаборатории в эндемичных странах не имеют достаточной инфраструктуры и/или квалификации для надежной диагностики. Некоторые из существующих региональных лабораторий в Африке имеют ограниченный потенциал, и большинство из них используют флуоресцентные тесты, а не ПЦР в реальном времени.

Основные пробелы в области диагностики представляют собой:

- 1) отсутствие коммерческих тестов для крупномасштабной и подтверждающей диагностики
- 2) валидацию серологических и вирусологических тестов для различных эпидемиологических ситуаций (например, низковирулентных и вирулентных штаммов ASFV).
- 3) Необходимо выполнить исследование биологических характеристик и определить серотипы и патотипы современных штаммов АЧС, что позволит экстраполировать такие характеристики с использованием лабораторных тестов *in vitro*.
- 4) Для замены трудоемких и гомогенных первичных культур для выделения вирусов необходимо найти культуры клеток, которые поддерживают репликацию ASFV.
- 5) При разработке диагностических тестов необходимо учитывать глобальную ситуацию с АЧС. Для некоторых сценариев можно было бы использовать индивидуальные подходы.
- 6) Для раннего выявления заболевания серологическими методами следует усовершенствовать системы на основе твердофазного ИФА, включая возможное использование альтернативных видов образцов.
- 7) Для изучения генетического разнообразия необходимы исследования, ориентированные на хозяев, входящих в энзоотический цикл заболевания в Африке.
- 8) Необходимо дальнейшее исследование экспресс-тестов и других полевых диагностических тестов.
- 9) Существует острая необходимость в дополнительных знаниях о свиньях, выживших после заболевания, с клинической точки зрения и точки зрения диагностики АЧС.
- 10) Следует вести поиск новых филогенетических маркеров, ассоциированных с патогенностью.
- 11) Необходима полевая валидация новых методов анализа с учетом их пригодности для конкретной цели и общей ситуации.
- 12) Необходимо активизировать подготовку кадров и последующую деятельность по гармонизации диагностических тестов на международном уровне.

## Аспекты, нуждающиеся в исследовании

- 1) Выявление/разработка клеточных линий, заменяющих первичные культуры, для улучшения методов выделения вируса.
- 2) Полная валидация новых или модифицированных тестов на основе твердофазного ИФА для обнаружения антител в альтернативных типах образцов (например, крови, тканевых экссудатах, слюне, мясном соке, фильтровальной бумаге и др.).
- 3) Улучшение стабильности реагентов в коммерческих диагностических наборах (для молекулярного вирусологического и серологического анализа) с учетом проблем, связанных с транспортировкой и сроком годности. Эту проблему можно преодолеть за счет различных стратегий, например, включения в гели, лиофилизации и т.д.
- 4) Автоматизация и стандартизация секвенирования вирусного генома для субтипирования штаммов ASFV.
- 5) Расширенная полевая валидация новых методов анализа с учетом сценариев, возникающих во всем мире.
- 6) Разработка и оценка неинвазивных методологий пробоотбора у диких свиней.
- 7) Валидация имеющихся инструментов для экспресс-диагностики с целью повышения эффективности обнаружения и улучшения эпиднадзора за дикими животными в Африке.
- 8) Разработка, оценка и полевая валидация коммерческих подтверждающих серологических тестов.
- 9) Стандартизация и валидация тестов на основе твердофазного ИФА для определения антител против антигенов слюны клеща *Ornithodoros* у укушенных животных.
- 10) Получение новой информации о роли выживших свиней как потенциальных источников вируса путем использования соответствующих диагностических серологических и вирусологических тестов для идентификации/обнаружения этих животных.
- 11) Исследование влияния и обнаружение изолятов с низкой вирулентностью и персистирующей инфекции

## ЭПИДЕМИОЛОГИЯ

Африканская чума свиней впервые была зарегистрирована в Африке в 1909 году после ввоза европейских домашних свиней в Кению. В то время она характеризовалась как острое геморрагическое заболевание со 100-процентной смертностью у домашних свиней (Montgomery *et al.* 1921). Впоследствии было обнаружено, что АЧС все это время присутствовала в Южной и Восточной Африке у диких свиней (Penrith *et al.*, 2013). Африка остается эндемичным регионом, где ежегодно возникает значительное количество вспышек АЧС (см. таблицу I). Вновь инфицированные страны Африки быстро становятся эндемичными; к ним относятся Центральноафриканская Республика, Чад, Эфиопия и ряд стран Западной Африки (Achenbach *et al.*, 2016; Brown *et al.*, 2018).

Первый занос АЧС за пределы Африки произошел в Португалии в 1957 г. в результате скармливания отходов авиаперевозок свиньям вблизи Лиссабонского аэропорта (Costard *et al.*, 2009; Gallardo *et al.*, 2015). Аналогичным способом произошел занос АЧС в Бразилию, где была зарегистрирована вспышка в 1978 году (Lyra 2006). Все случаи заноса АЧС за пределами Африки были успешно ликвидированы, за исключением инфекции на острове

Сардиния, Италия. Однако в июне 2007 года Республика Грузия уведомила МЭБ о вспышке АЧС в Кавказском регионе, предположительно вызванной кормлением свиней зараженной АЧС свининой, доставленной на судах из Африки (Rowlands *et al.*, 2008). С тех пор вспышки АЧС были зарегистрированы в 16 новых странах, в том числе России, странах Восточной Европы и Балтии (Wozniakowski *et al.*, 2016; Nurmoja *et al.*, 2017), Болгарии, Румынии, Венгрии, Польше, Бельгии, Чешской Республике, а в августе 2018 года зарегистрирована первая вспышка АЧС в Китае (см. таблицу I).

Эпидемиология АЧС может существенно различаться в разных странах, регионах и континентах. Для АЧС выявлено два типа циклов передачи, основанных главным образом на способе передачи вируса среди различных популяций свиней: цикл у домашних свиней и энзоотический цикл у диких свиней (Costard *et al.*, 2009). Наличие/отсутствие членистоногих-переносчиков (т. е. видов клещей) в пострадавшем регионе влияет на распространение и поддержание вируса в окружающей среде (Plowright *et al.*, 1994). В Африке к югу от Сахары ASFV сохраняется в энзоотическом цикле в организмах бородавочников и клещей рода *Ornithodoros*. В эндемичных районах Африки инфицированные клещи и бородавочники являются источником вируса, ответственного за вспышки заболевания у домашних свиней. После внедрения вирус эффективно передается контактным путем между домашними свиньями (см. обзор Tulman *et al.*, 2009). Инфекции при прямом контакте домашних свиней с бородавочниками не наблюдалось (Costard *et al.* 2009.). Таким образом, АЧС может демонстрировать уникальные региональные модели проявления, связанные с уникальным набором факторов риска, которые следует оценивать при установлении надлежащих стратегий надзора и контроля.

Среди изолятов вируса из стран Африки к югу от Сахары выявлено 24 различных генотипа *p72*. Однако использование *p72* для генотипирования позволяет выполнить только начальное исследование характеристик и не дает прямых данных о перекрестном иммунитете к различным генотипам или их вирулентности. За пределами Африканского континента были обнаружены лишь изоляты, принадлежащие к западноафриканскому генотипу *I p72*. Однако вспышка в Грузии в 2007 году и все последующие вспышки АЧС в Кавказском регионе были вызваны новым изолятом, связанным с генотипом *II p72*, циркулирующим в Юго-Восточной Африке с 1989 года. С тех пор АЧС распространилась на соседние страны - Армению, Азербайджан и Российскую Федерацию - вплоть до Центральной и Западной Европы, и самый последний случай заноса произошел в Китае, где имеется крупнейшая популяция свиней в мире. Вспышка в Азии в 2018 году подтвердила, что угроза распространения АЧС в страны за пределами Африканского континента высока и может быть связана с катастрофическими последствиями для мирового свиноводства.

Хотя значение генотипов африканской чумы свиней в биологии вируса не вполне понятно, оно внесло свой вклад в знания о распространении и эволюции ASFV. Важно продолжать исследования штаммов АЧС в эндемичных регионах, как это было продемонстрировано в недавних сообщениях о выявлении новых генотипов в Мозамбике (Quembo *et al.*, 2017) и Эфиопии (Achenbach *et al.* 2017.).

На основании имеющихся в настоящее время данных можно установить следующее распределение типов вируса АЧС в регионах мира:



- Западная Африка (Генотип I)
- Восточная и Центральная Африка (все известные генотипы)
- Сардиния (Генотип I)
- Кавказ, Россия, Европа (генотип II)
- Китай (генотип II)

### **Недостаточно изученные аспекты**

Сохраняется потребность в знаниях о молекулярной эпидемиологии изолятов ASFV, главным образом в популяциях диких животных и организме клещей. Генотипирование на основе ПЦР может быть подходящим инструментом в эндемичных районах, например, странах Африки к югу от Сахары; однако в случае вспышки в новых географических регионах единственной наиболее важной задачей является выполнение секвенирования вирусного генома. Это позволит получить важную информацию не только о потенциальном происхождении вируса, но и о возможной гомологии с другими штаммами.

### **Аспекты, нуждающиеся в исследовании**

- 1) Продолжение молекулярно-эпидемиологических исследований для мониторинга популяций содержащихся в неволе и диких свиней, а также распространения клещей имеет важное значение для эффективного решения проблемы ASFV в эндемичных районах. Эти исследования также имеют большое значение для программ профилактики и эпиднадзора.
- 2) Разработка твердофазного ИФА для выявления наличия клещей.
- 3) Необходимость обнаружения, выделения и изучения вируса у хозяев энзоотического цикла в Африке для целей генотипирования.
- 4) Продолжение исследований биологических и молекулярных характеристик изолятов, циркулирующих в настоящее время в Африке и Европе.
- 5) Выявление и использование новых филогенетических маркеров, ассоциированных с вирулентностью вируса, для понимания эволюции вируса в эндемичных областях.
- 6) Получение новых знаний в области социально-экономических аспектов заболевания и цепей создания добавленной стоимости свиней и свинины, особенно в условиях низкой биобезопасности.
- 7) Получение новых знаний о затратах (прямых и косвенных), связанных с АЧС как в эпидемических, так и в эндемических ситуациях.
- 8) Выявление улучшенных административных средств для контроля заболевания у кабанов.
- 9) Получение новых знаний о роли заражения окружающей среды и кровососущих насекомых в цикле заболевания.
- 10) Следует выполнить оценку и моделирование эпидемиологии АЧС в программах борьбы с чрезвычайными ситуациями на уровне отдельных свиней, стада и демографии региона (при низкой и высокой плотности популяции свиней).



- 11) Необходимо выполнять оценку риска по отношению к контролю или распространению ASFV.

### **ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЙ НАДЗОР**

Клиническая картина АЧС у домашних свиней зависит от вирулентности циркулирующего вируса. Заражение домашних свиней приводит к нескольким формам заболевания, начиная от острых проявлений с высокой смертностью до субклинических форм в зависимости от факторов, связанных с вирусом и организмом хозяина. (Tulman *et al.*, 2009).

В отличие от домашних свиней, у диких африканских свиней, инфицированных ASFV, как правило, симптомы заболевания отсутствуют, а титр вирусии невысок (Heuschele и Coggins 1969; Montgomery 1921; Plowright 1981; Thomson 1985). Эти особенности картины АЧС и сходство клинической манифестации с другими заболеваниями свиней затрудняют выполнение эпиднадзора исключительно на основе клинических признаков. Исходя из сложности эпидемиологии АЧС и множественных клинических проявлений заболевания, необходимо разработать мероприятия эпиднадзора на основе диагностического тестирования.

Стоит отметить, что ни один из неинвазивных методов, предложенных для свиней или кабанов, не позволяет эффективно обнаруживать вирус, поскольку они не выделяют вирус. Если бы они жевали веревки, можно было бы обнаружить антитела. Основной аспект связан с возможностью использования в рамках эпиднадзора клещей, обитающих в норах бородавочников, хотя для подтверждения достоверности отрицательного результата необходимо выполнение большого количества анализов (личное сообщение Marie Louise Penrith).

### **Недостаточно изученные аспекты**

- 1) эпиднадзор является наиболее важной мерой противодействия, позволяющей ликвидировать заболевание в зачатке путем раннего обнаружения и локализации вспышки заболевания. Однако для выявления различных клинических проявлений, вызванных инфекцией ASFV, требуются различные стратегии эпиднадзора. В случае острой инфекции действия эпиднадзора могут основываться на клинических признаках; однако в легких случаях или при хронических инфекциях, когда распознать симптомы АЧС сложнее, эпиднадзор должен основываться на диагностическом тестировании в дополнение к клиническим признакам.
- 2) пассивный эпиднадзор часто является единственным экономически приемлемым решением для многих стран, но имеет много недостатков из-за трудности дифференциации АЧС от классической чумы свиней и от других распространенных эндемичных инфекционных заболеваний свиней, при которых могут иметь место аналогичные клинические признаки.
- 3) программы активного эпиднадзора являются дорогостоящими и в настоящее время должны быть основаны на прямых диагностических тестах, например, выделении вируса и генетическом анализе, из-за проблем и недостатков иммунологических анализов.
- 4) В случае персистирующей инфекции эффективный эпиднадзор является трудным и дорогостоящим мероприятием ввиду отсутствия подозрительных признаков.

Действия в рамках эпиднадзора могут быть основаны на показателях мертворождения на уровне стада или других репродуктивных параметрах. Однако такой показатель может характеризоваться недостаточной специфичностью и быть экономически необоснованным. Эта категория инфекции представляет собой критическую уязвимость при разработке комплексной системы эпиднадзора за АЧС.

#### **Аспекты, нуждающиеся в исследовании**

- 1) оценка эффективности и общей точности имеющихся в настоящее время тестов на основе твердофазного ИФА и ПЦР для эпиднадзора в экспериментальных условиях.
- 2) разработка и оценка новых тестов, например, твердофазного ИФА для обнаружения антигенов и антител, для целей эпиднадзора.
- 3) разработка тестов для обнаружения ASFV в клещах.
- 4) для валидации эпидемиологического надзора при вспышках необходимо проведение эпидемиологических исследований по внедрению экстренных мер контроля и использованию диагностических тестов для выявления инфицированных свиней в пострадавших популяциях.

#### ***ДИКИЕ СВИНЬИ И ДИКИЕ ПРЕДСТАВИТЕЛИ СЕМЕЙСТВА СВИНЫЕ***

Дикие свиньи и дикие представители семейства свиные могут играть важную роль в распространении и поддержании АЧС. Для дальнейшего понимания потенциальной роли диких свиней в качестве резервуара АЧС необходимы дополнительные исследования.

#### ***КЛЕЩИ-ПЕРЕНОСЧИКИ***

Важно определить, могут ли клещи в пострадавшем регионе (где произошла вспышка АЧС) стать биологическими переносчиками или нет. Данные исследования включают определение способности нового изолята ASFV эффективно инфицировать местных клещей и возможности их персистирующей инфекции. Необходимы дополнительные исследования распространения аргасовых клещей.

# ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ МЕР ПРОТИВОДЕЙСТВИЯ

## **Предпосылки.**

Нижеизложенные теоретические положения, выдвинутые рабочими группами GARA, использовались для оценки эффективности потенциальных мер, повышающих возможности сдерживания и ликвидации вспышек АЧС.

## **Ситуация.**

Выполнена оценка мер противодействия для худшего варианта развития событий: намеренное и координированное распространение контаминированного ASFV материала в регионе с высокой плотностью популяции свиней в стране, ранее благополучной по АЧС.

## **Целевые популяции.**

Выполнена оценка мер противодействия по целевым сегментам свиноводства, исходя из следующего приоритетного порядка:

1. Свиньи в частных подворьях.
2. Коммерческие свинокомплексы, осуществляющие опорос, откорм и убой свиней.
3. Коммерческие предприятия по разведению свиней в закрытых помещениях.
4. Крупные свинофермы на базе закрытых помещений.
5. Племенные стада коммерчески ценных пород свиней.

## **Масштабы вспышки.**

Эффективность мер по борьбе с АЧС оценивали для множественных вспышек в частных подворьях; в трех предприятиях по опоросу; на одной скотобойне; одной ферме по разведению ремонтных свиноматок; циркуляции вируса у диких свиней.

## **Вакцинация животных**

В условиях отсутствия вакцины против АЧС единственная стратегия контроля основывается на раннем выявлении зараженных животных и их уничтожении, а также на строгом контроле перемещений поголовья.

## **МОДЕЛЬ РЕШЕНИЯ**

Рабочие группы по анализу недостаточно изученных аспектов использовали количественную модель принятия решений Кепнера-Трего для оценки эффективности доступных вакцин и средств диагностики, в том числе экспериментальных продуктов. Инструкции по использованию модели были разработаны ранее на научных семинарах GARA (см. приложение I). Критерии и весовые коэффициенты в данной модели были модифицированы рабочими группами для оценки доступных мер противодействия, а также экспериментальных вакцин и средств диагностики АЧС (см. приложения II, III, IV, V и VI).

### **Критерии.**

Рабочие группы отметили следующие наиболее важные критерии для сравнения эффективности мер противодействия:

Вакцины:

- Эффективность
- Безопасность
- Одна доза
- Скорость масштабирования производства
- Условия хранения
- Распространение/поставки
- Возможность массовой вакцинации
- Возможность дифференциации инфицированных и вакцинированных животных
- Период каренции
- Стоимость внедрения (стоимость продукции, стоимость замены, расходы на разработку, стоимость введения)

Диагностикумы:

- Чувствительность
- Специфичность
- Прямое обнаружение (антиген/ДНК), дифференциация инфицированных и вакцинированных животных во время вспышки
- Непрямое обнаружение (антитела) с возможностью дифференциации инфицированных и вакцинированных животных в общем случае и при надзоре после окончания вспышки
- Валидированность метода
- Скорость масштабирования при производстве
- Пропускная способность
- Экспресс-тест
- Скорость получения результатов
- Необходимость подтверждающих тестов
- Простота выполнения
- Хранение/распределение/поставка
- Стоимость внедрения

## Весовые коэффициенты

Для каждого критерия были заданы весовые коэффициенты для количественного сравнения значимости выбранных средств.

## Профиль продукта

Для обеспечения последовательной и содержательной оценки для каждой меры противодействия был задан желательный (т.е. эталонный) профиль продукта:

Желательный профиль вакцины:

1. Высокоэффективна; предотвращает передачу вируса; эффективна для свиней любого возраста, в том числе замещает материнские антитела; иммунитет сохраняется в течение года.
2. Безопасна для свиней всех возрастов; штаммы живых вакцин не реверсируют к вирулентному типу.
3. Одной дозы достаточно для создания иммунитета.
4. Быстрая скорость производства и масштабирования производства, возможность быстрой доставки готового продукта, большое количество доз в партии продукта.
5. Срок годности не менее 2 лет.
6. Производитель имеет эффективные системы хранения и сбыта вакцины.
7. Обеспечивает защиту уже на 7-ые сутки или ранее.
8. Возможность эффективно и надежно дифференцировать инфицированных и вакцинированных животных.
9. Короткий период каренции перед возможностью использования продукции в пищевых целях.
10. Стоимость продукта, хранения и введения.

Желательный профиль диагностического теста:

1. Обнаруживает все генотипы АЧС.
2. Прямые тесты для контроля и ликвидации.
3. Непрямые тесты для контрольного мониторинга после вспышки и выявления субклинических случаев заболевания.
4. Быстрый тест с ранними сроками выявления вируса.
5. >95% специфичность.
6. >95% чувствительность.
7. Экспресс-тест.
8. Позволяет дифференцировать инфицированных и вакцинированных животных.
9. Метод прошел валидацию для применения в полевых условиях.
10. Простота выполнения/обучения персонала.
11. Масштабируемость.
12. Приемлемая цена.

## Ценность продукта

Итоговые оценки для каждого продукта отражают коллективное мнение членов рабочих групп по АЧС.



## **ВАКЦИНЫ.**

Рабочие группы GARA по анализу недостаточно изученных аспектов отмечают, что текущие исследования подходящих вакцин для вируса АЧС выполняют лишь несколько исследовательских групп в мире. Сводная информация по вакцинам, представленным в рецензируемых научных публикациях за период с 2012 по 2018 года, приведена в таблице II. На сегодняшний день наиболее перспективными вакцинами-кандидатами являются рационально аттенуированные рекомбинантные живые штаммы с делецией генов. В более ранних работах описаны гены вирулентности и иммуномодуляции, удаление которых приводит к созданию перспективного кандидатного вакцинного штамма. Использование живых аттенуированных вирусов в качестве вакцин является распространенным подходом, обеспечивающим хорошие параметры защиты, однако существуют доказательства случаев реверсии экспериментальных вакцин к вирулентным штаммам. Использование рекомбинантных технологий также позволяет осуществлять вставку подходящих маркеров для разработки DIVA-вакцин, что крайне важно при любой вспышке. На данный момент не существует ни одного кандидатного штамма, должным образом аттенуированного для обеспечения как безопасности, так и эффективности, но нескольким лабораториям в последние годы удалось добиться прогресса в разработке безопасных и эффективных экспериментальных вакцин-кандидатов. Альтернативой живым аттенуированным вирусам являются субъединичные вакцины, которые позволяют устранить риск реверсии к вирулентному состоянию. Они соответствуют вопросам безопасности и обеспечивают эффективную дифференциацию инфицированных и вакцинированных животных. Хотя существующие данные показывают, что использование этой стратегии не помогло достичь эффективного уровня защиты против инфекции ASFV, в настоящее время ведутся довольно многообещающие исследования реализуемости такой стратегии создания вакцины против АЧС. В совокупности, прогресс в области разработки работающей вакцины и предварительные данные свидетельствуют о том, что вакцины первого поколения могут стать доступны в ближайшее время.

### **Итог.**

Вакцинация против АЧС по-прежнему недоступна, однако в разработке рационально аттенуированной живой вирусной вакцины отмечается некоторый прогресс.

### **Оценка экспериментальных вакцин (см. приложение II)**

Рабочие группы GARA по анализу недостаточно изученных аспектов обсудили характеристики различных экспериментальных вакцин и оценили их эксплуатационные параметры в соответствии со списком критериев, соответствующих профилю идеальной вакцины против АЧС. Ниже приведено сводное мнение группы по каждой из них:

- 1) *Рекомбинантная живая делеционная вакцина против ASFV.* Аттенуирована путем делеции генов, идентифицированных как детерминанты вирулентности. Аттенуированные штаммы эффективно защищали свиней от экспериментального заражения исходным вирулентным вирусом спустя 28 дней после вакцинации. Рабочая группа признала эффективность данной экспериментальной вакцины: для получения эффективной защиты требуется лишь разовая иммунизация, иммунитет вырабатывается быстро, его продолжительность приемлема, вакцина безопасна для

свиней и содержит молекулярные структуры для разработки DIVA-теста. Основным недостатком заключается в отсутствии защиты против гетерологичных штаммов, хотя недавние результаты показали наличие перекрестного иммунитета против генотипически различающихся изолятов.

- 2) *Субъединичные рекомбинантные белки вируса АЧС, экспрессируемые различными вакцинными векторами.* Для создания вакцин использовались различные рекомбинантные векторы, содержащие отдельные гены АЧС, например, вирусы осповакцины, оспы енотов, Ankara, оспы свиней, аденовирус человека. Безопасность, быстрое формирование иммунитета, возможность разработки DIVA-теста и стоимость внедрения являются сильными сторонами данных вакцинных платформ. В то же время важно отметить, что за исключением недавнего отчета, содержащего предварительные данные, в экспериментах не обнаружено значимого защитного эффекта отдельного гена или группы генов AFSV в составе любого вектора при экспериментальном заражении домашних свиней гомологичными вирусами. Из этого следует, что разработка субъединичных вакцин против ASFV зависит от дальнейших исследований по поиску протективных антигенов и элементов структуры вируса, способных индуцировать защиту против инфекции.
- 3) *ДНК-вакцины против ASFV.* Технически они также являются субъединичными вакцинами, в которых ген/гены АЧС клонированы в ДНК-конструкте, используемом в качестве иммуногена. Их безопасность и возможность разработки DIVA-теста являются единственными преимуществами, отмеченными экспертами на семинаре GARA по анализу недостаточно изученных аспектов. Как и в случае вакцин-кандидатов, проанализированных выше в п. (2), на данный момент не выявлено генов ASFV, которые можно использовать в составе субъединичных вакцин.

Основываясь на вышеизложенных аналитических данных, рабочие группы GARA по анализу недостаточно изученных аспектов пришли к выводу, что наиболее перспективными являются экспериментальные вакцины на основе рационально аттенуированных штаммов АЧС. Тем не менее, члены групп также отметили недостаток экспериментальных данных, касающихся нескольких аспектов их базовой разработки, в том числе времени индукции иммунитета, возможной реверсии к вирулентным штаммам и разработки DIVA-совместимых диагностикумов.

### **ДИАГНОСТИКА**

Группы GARA по анализу недостаточно изученных аспектов пришли к выводу о высокой эффективности данной меры противодействия. Раннее выявление АЧС важно для локализации вспышки и снижения экономического ущерба. Эпидемиологический надзор за АЧС в США реализуется путем комбинации программ по пассивному и активному эпиднадзору. Немаловажную роль играет диагностика и в фазе восстановления на территориях, где произошли вспышки.

### **Сводная информация.**

- При любом подозрении на болезнь следует одновременно выполнять тесты для обнаружения вируса и антител.
- Гуморальный ответ на ASFV выявляется с 7-10 суток.



- Обнаружение вируса АЧС возможно на 2-3 сутки после заражения. Антитела к заболеванию сохраняются в течение длительного времени.
- Инкубационный период занимает от 3 до 15 суток. Более вирулентные штаммы вызывают сверхострую или острую геморрагическую болезнь, характеризующуюся лихорадкой, потерей аппетита, кровоизлияниями в коже и внутренних органах, смертью на 3-10 сутки, иногда до появления первых клинических признаков.

#### **Оценка лабораторных и коммерческих диагностических тестов (см. приложения III и IV).**

Рабочие группы определили и оценили шесть видов диагностических тестов, которые можно использовать для мониторинга, подтверждения результатов и контроля на территориях после вспышки. Эти тесты повсеместно доступны для использования в лабораториях, а один из тестов имеется в продаже. Качество тестов оценивали в сравнении с желательным профилем диагностикума для контроля и ликвидации АЧС (см. приложение D).

##### 1) Выделение вируса.

Выделение вируса на первичной культуре макрофагов свиньи является классическим методом обнаружения инфекционного вируса. Заражение культуры обнаруживают по гемадсорбции или проявлению цитопатогенного эффекта. Члены рабочих групп по противодействию АЧС подчеркнули, что специфичность, точность (подтверждающие тесты не требуются) и чувствительность данного метода являются его преимуществами. Однако данный метод имеет и недостатки: тест занимает несколько дней, его сложно масштабировать, невозможно использовать в высокопроизводительных системах, и выполнение теста требует специальных навыков.

- 2) *Традиционная ОТ-ПЦР.* Данный метод основан на использовании праймеров для консервативной области гена р72. Метод отличается хорошей специфичностью и чувствительностью, прошел валидацию, легко масштабируется и позволяет получить быстрый результат. К сожалению, данный метод нуждается в подтверждающих тестах, а его выполнение требует специальных навыков.
- 3) *ОТ-ПЦР в реальном времени.* Тест характеризуется высокой специфичностью, быстротой анализа, легкостью использования в высокопроизводительных системах и масштабирования. Как и традиционная ПЦР, данный метод требует подтверждающего теста и специальных навыков для правильного выполнения.
- 4) *Реакция иммунофлуоресценции.* Данный метод основан на обнаружении вируса в тканях инфицированных животных с использованием флуоресцентных антител против АЧС. Тест высокоспецифичен, прошел валидацию, дешев, позволяет получить окончательный результат в течение короткого времени. Недостатки метода - сложность использования в высокопроизводительной системе и масштабирования, высокие требования к квалификации оператора.
- 5) *Твердофазный ИФА антигена.* Метод основан на обнаружении вируса с помощью антител против АЧС, фиксированных на планшете. Метод характеризуется высокой специфичностью, но низкой чувствительностью. Этот метод можно использовать в

высокопроизводительных системах и масштабировать. Кроме того, он прост в выполнении и позволяет быстро получить результат. Недостатком, помимо низкой чувствительности, является отсутствие валидации метода, высокая стоимость и необходимость подтверждения результата другими тестами.

- 6) *Мультиплексная ПЦР*. Мультиплексная ОТ-ПЦР позволяет одновременно выявлять и дифференцировать вирус АЧС от вируса КЧС (Agüero *et al.*, 2004). Метод высокочувствителен, специфичен, прошел валидацию с использованием клинического материала полевых образцов и от экспериментально зараженных свиней. Тест может быть полезен в случае подозрения на геморрагическую болезнь свиней, особенно в странах/регионах, где одновременно циркулируют оба вируса.

### **Оценка экспериментальных диагностикумов (см. приложения V и VI).**

Рабочие группы GARA по анализу недостаточно изученных аспектов выявили и обсудили несколько новых технологий, потенциально применимых для диагностики АЧС в лаборатории или в качестве экспресс-тестов в полевых условиях.

- 1) *Петлевая изотермическая амплификация нуклеиновых кислот (LAMP)*. Метод основан на амплификации нуклеиновых кислот без ПЦР-оборудования. Для этого используется комбинация ДНК-полимеразы с высокой активностью замещения цепи и 4-6 праймеров к шести областям ДНК-мишени (Notomi *et al.*, 2000). LAMP считается высокоспецифичным и чувствительным инструментом, позволяющим обнаруживать амплифицированный продукт даже невооруженным глазом. Сравнительная простота технологии позволяет адаптировать LAMP для первичных тестов в региональных лабораториях, диагностики в простых ситуациях и даже для экспресс-анализа в полевых условиях. Недавно разработано несколько диагностикумов на основе LAMP для обнаружения вируса АЧС, и в настоящее время проводятся процедуры стандартизации и валидации данных тест-систем (Hertjner and Allan, QUB, Belfast, UK).
- 2) *ПЦР в реальном времени с использованием коммерческих универсальных библиотек зондов (UPL)*. Данный метод был недавно коммерциализирован *Roche Applied Science* и представляет собой набор коротких зондов, полученных путем гидролиза ДНК, первоначально разработанный для анализа экспрессии генов и предлагаемый в качестве универсальной системы обнаружения. В настоящее время UPL также применяют для обнаружения возбудителей заболеваний, причем ее главными преимуществами являются сравнительно низкая стоимость, быстрота изготовления и простота применения. Сочетание специфического набора праймеров и подходящего UPL-зонда позволяет с высокой специфичностью и чувствительностью детектировать вирус АЧС посредством ПЦР в реальном времени при сравнительно низкой стоимости анализа. Недавно разработаны и стандартизованы два диагностикума на основе ПЦР в реальном времени с использованием UPL для разных участков генома вируса АЧС (Fernández-Pinero, Gallardo, and Arias, CISA-INIA, Valdeolmos, Spain). В настоящее время идет процесс валидации их пригодности к использованию при диагностике.
- 3) *ПЦР с линейной фазой амплификации после экспоненциальной фазы (LATE-PCR)*. Это - модифицированный метод асимметричной ПЦР, позволяющий наработать большое количество одноцепочечной ДНК; обнаружение осуществляется за счет специфического зонда с низкой температурой плавления. Для данной системы

характерно несколько преимуществ, в том числе более короткое время термоциклирования и более высокая емкость мультиплекса по сравнению с обычной ПЦР (Sánchez *et al.*, 2004). Недавно разработан метод LATE-PCR для обнаружения вируса АЧС (Hakhverdyan, Stahl, and Belák, SVA, Uppsala, Sweden; в сотрудничестве с Ronish and Wangh, Brandeis University, USA). Технология LATE-PCR лицензирована *Smiths Detection*, поэтому разработанный метод обнаружения АЧС будет адаптирован к использованию с портативной ПЦР-платформой *BioSeeq*, что позволит получить надежную, мощную и простую в применении диагностическую систему для обнаружения вируса АЧС в полевых условиях при широком диапазоне параметров окружающей среды.

- 4) *Иммунохроматографические устройства (LFD)*. В настоящее время идет разработка иммунохроматографического теста, позволяющего специфически обнаруживать антитела против АЧС в образцах сыворотки. Этот качественный тест основан на прямом иммуноанализе; детектирующим агентом являются латексные микрочастицы, ковалентно связанные с очищенным белком вируса АЧС. Реагент для захвата представляет собой вирусный белок, адсорбированный на полоске нитроцеллюлозной мембраны и образующий тестовую линию. Вторая линия находится выше тестовой, образована иммобилизованными антителами против контрольного белка и выполняет роль контроля правильности постановки теста. Образец сыворотки наносят на площадку для образца. Антитела против специфической мишени, присутствующие в образце, специфически связываются с мечеными микрочастицами. Комплекс белок-антитело движется по нитроцеллюлозной мембране под действием капиллярных сил и взаимодействует с иммобилизованным вирусным белком, образуя видимую тестовую линию.

#### **ДЕЗИНФЕКТАНТЫ/ИНАКТИВАЦИЯ ВИРУСА**

Данные по выживаемости вируса АЧС в фекалиях и моче экспериментально зараженных животных недавно исследованы Davies *et al.*, 2017. Исходя из расчетов, можно предположить, что вирус АЧС остается активным при 37°C в течение 4 дней (в моче) или 3 дней (в кале). В исследовании Turner and William, 1999, было обнаружено, что при 40°C инактивация вируса АЧС в навозе происходила в течение 4 часов, а при 65 °C - в течение 5 минут (см. таблицу IV).

#### **Дезинфектанты**

Использование эффективных дезинфектантов для очистки зараженных помещений, грузовиков и предметов, через которые может передаваться инфекция, является важной мерой по предотвращению разноса АЧС. Тем не менее, многие из распространенных дезинфектантов являются неэффективными. Выбор средства должен основываться на наличии подтвержденной эффективности против вируса АЧС. Ряд методов инактивации и дезинфектантов протестировали в отношении различных материалов, включая отходы от животных. В таблице IV приведен полный список дезинфектантов, рекомендации по применению в полевых условиях, эффективные концентрации, время выдержки и ссылки на исследовательские работы.

#### **Переработка**



Переработка продуктов животного происхождения строго регулируется в Европе и включает стерилизацию при 3 атмосферах и 133°C в течение 20 минут. Любая обработка при температуре выше 70° в течение 20 минут (или при 60°C в течение 30 минут) приведет к инаktivации вируса АЧС; следовательно, такие условия переработки гарантированно инаktivируют вирус.

### **Биогазовые установки**

Вирус африканской чумы свиней также можно инаktivировать в биогазовой установке в течение нескольких часов (термофильные установки) или дней (мезофильные). Процесс инаktivации осуществляется за счет как температурного фактора, так и смещения рН, воздействия на вирус метаболитов и т.д. Тем не менее, следует иметь в виду, что такие установки не предназначены для четкого разделения материала на «заразный» и «чистый» (в отличие от лабораторий с высоким уровнем биобезопасности или современных установок по переработке). По этой причине могут потребоваться дополнительные меры (предварительное нагревание, адаптация процесса под конкретную задачу) для безопасной инаktivации и защиты от повторной контаминации. В докторской диссертации Andres Moss (Moss A. 2001) предложен метод предварительного нагревания материалов животного происхождения до 70°C. Однако в полевых условиях это может быть затруднительно.

### **Захоронение туш**

Исследования по оценке инаktivации вируса АЧС в захороненных тушах продолжаются; предполагается, что ограничивающим фактором для выживания вируса является рН почвы лесов. Данные будут обновлены по мере выполнения соответствующих экспериментов.

### **АКАРИЦИДЫ**

Использование акарицидов может быть малоэффективным, т.к. клещ покинет хозяина и может закопаться в землю или спрятаться в трещинах зданий. Оптимальным в данной ситуации является перемещение свиней из зараженных помещений.

### **ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ПРЕПАРАТЫ**

Лицензированных противовирусных препаратов для лечения свиней от АЧС не существует. В некоторых публикациях есть информация о веществах с выраженным действием против вируса АЧС (Quetglas *et al.*, 2012; Nakobyan *et al.*, 2017; Barrado-Gil *et al.*, 2017, и т.д.). Среди них встречаются одобренные FDA медицинские препараты, а также активные натуральные продукты (Fabregas *et al.*, 1999; Galindo *et al.*, 2011). Тем не менее, возможность их использования при АЧС до сих пор не исследована. С эпидемиологической и экономической точек зрения полезным представляется использование противовирусных препаратов в дополнение к стратегии вакцинации или вынужденного уоя. Например, при классической чуме свиней, еще одном эпизоотическом заболевании свиней, использование противовирусных препаратов в комбинации с другими распространенными мерами противодействия, например, массовым вынужденным убоем и экстренной вакцинацией позволяло эффективно контролировать масштаб вспышек в районах с высокой плотностью поголовья свиней (Backer *et al.*, 2013). В случае с АЧС возможными преимуществами могут являться потенциальное снижение титров вируса в крови и его выделения в окружающую среду от зараженных животных, а также снижения риска распространения вируса до начала

вынужденного убоя. Таким образом, применение противовирусных препаратов на зараженных фермах может снизить риск передачи и предотвратить распространение вируса среди восприимчивых животных (стратегия «пояса сдерживания»). Эти вещества также можно использовать в качестве добавок в рамках стратегий комбинированного применения противовирусных средств и вакцинации животных для снижения времени персистенции живых аттенуированных вакцин, однако данный вопрос требует дополнительных исследований. Продемонстрировано, что липофильные статины до некоторой степени активны против вируса АЧС (Quetglas *et al.*, 2012) и могут применяться в качестве адъюванта в вакцине (Xia *et al.*, 2018). Необходимы дальнейшие исследования для понимания механизмов действия противовирусных препаратов и возможности их использования при разработке новых кандидатных вакцин.

### ***СРЕДСТВА ИНДИВИДУАЛЬНОЙ ЗАЩИТЫ (СИЗ)***

АЧС не опасна для человека. СИЗ должны подходить для предотвращения переноса вируса лицами, участвующими в ликвидации вспышки.

# РЕКОМЕНДАЦИИ

## **ИССЛЕДОВАНИЯ**

GARA рекомендует руководствоваться данным списком приоритетов для проведения исследований по улучшению средств и мер по обнаружению, контролю и реагированию на вспышки АЧС, включая нарастающий контроль и ликвидацию АЧС на эндемичных территориях.

## **Вирусология**

- Полногеномное секвенирование вирусов АЧС каждого генотипа, штаммов с различной вирулентностью, а также штаммов, реплицирующихся исключительно в организме домашних свиней, диких свиней и клещей.
- Определение эталонных последовательностей, подтвержденных несколькими методами в разных лабораториях, для избегания ошибок секвенирования в повторяющихся областях ДНК или других сложных последовательностях.
- Гармонизация протоколов секвенирования и валидация методов обогащения ДНК и исключения материала хозяина.
- Разработка биоинформатического ресурса для сбора всеобъемлющей базы данных по вирусу АЧС, включая полногеномные последовательности большого количества изолятов для замены существующей малозначимой классификации по генотипам.

## **Патогенез вируса**

- Основные параметры передачи вируса от хозяина к хозяину, включая как домашних свиней и кабанов, так и членистоногих.
- Изучение патогенеза изолятов вируса АЧС с различной вирулентностью у хозяев с различной восприимчивостью.
- Определение закономерностей активации иммунологически значимых генов хозяина на ранних стадиях после инфекции.
- Выявление генов вируса АЧС и генетических детерминант, отвечающих за круг хозяев, вирулентность и патогенность. Проведение корреляции между данными транскриптомики и протеомики.
- Дальнейшие исследования детерминант вирулентности у различных генотипов и штаммов вируса АЧС.

## **Иммунология**

- Исследование иммунных механизмов, опосредующих эффективную защиту против гомологичных и гетерологичных штаммов вируса.
- Выявление вирусных генетических структур, коррелирующих с наличием/отсутствием протективного иммунитета к гомологичным или гетерологичным штаммам.
- Выявление вирусных белков, участвующих в индукции протективного иммунного ответа.
- Выявление регуляторных генов, отвечающих за продукцию провоспалительных цитокинов и антител, оценка их роли в инфекционности/вирулентности вируса для свиней.



- Разработка новых методов анализа, основанных на клеточном иммунитете, для ранней диагностики болезни.
- Исследования иммунопатогенетических механизмов, включая Т-клеточный ответ и действие ГКГС.
- Определение роли мультигенных семейств в антигенной вариабельности и уклонении от иммунного ответа.
- Выявление и описание генов, связанных с устойчивостью хозяина к инфекции.

### **Эпидемиология**

- Создание глобальной системы надзора за АЧС, обеспечивающей доступ к качественной, точной и актуальной информации по риску, связанному с АЧС, с целью восполнения недостатка информации о ситуации с АЧС в мире и улучшения контроля и ликвидации заболевания в мировом масштабе.
- Дальнейшие исследования в области молекулярной эпидемиологии по мониторингу популяций свиней в неволе и дикой природе, а также распространению аргасовых клещей, важны для эффективного решения проблемы вируса АЧС в эндемичных районах. Данные исследования также важны для программ профилактики и эпиднадзора.
- Проведение валидации существующих систем на основе твердофазного ИФА в полевых условиях для выявления присутствия клещей.
- Необходимо усилить меры по обнаружению, выделению и описанию изолятов от хозяев, входящих в энзоотический цикл АЧС в Африке, с целью их генотипирования.
- Дальнейшее изучение биологических и молекулярно-генетических характеристик изолятов, циркулирующих в Европе и Африке в настоящее время.
- Выявление новых филогенетических маркеров, ассоциированных с вирулентностью, и их использование для понимания процессов эволюции вируса в эндемичных областях.
- Установление социально-экономического эффекта болезни и целей образования добавочной стоимости свиней и свинины, особенно в условиях низкого уровня биобезопасности.
- Уточнение затрат (прямых и косвенных) из-за АЧС в ситуациях эпидемических вспышек и эндемичных для вируса территорий.
- Создание административных средств для контроля заболевания у диких кабанов.
- Исследование роли контаминации окружающей среды и кровососущих насекомых в цикле заболевания.
- Использование широкого круга серологических и вирусологических инструментов для выявления/обнаружения переживших инфекцию животных с целью определения их роли как потенциальных источников вируса.

### **Эпидемиологический надзор**

- Дальнейшая оценка точности и производительности существующих тестов на основе твердофазного ИФА и ПЦР в экспериментальных и полевых условиях.
- Автоматизация и стандартизация протоколов секвенирования вирусного генома для субтипирования штаммов вируса АЧС.



- Оценка скорости распространения штаммов вируса АЧС с разной вирулентностью в экспериментах с инфицированными и контактными животными.
- Необходимо выполнить оценку и моделирование эпидемиологии АЧС на уровне отдельных свиней, стада, популяции в регионах с разной плотностью животных в рамках программ по контролю вспышек.
- Оценка риска должна производиться по отношению к контролю или распространению вируса АЧС

### Диагностика

- Поддержание разработки новых технологий для создания экспресс-тестов
- Тестирование и валидация коммерческих экспресс-тестов на предмет пригодности при эпиднадзоре, реагировании на вспышку и восстановлении после нее.
- Выявление/разработка новых клеточных линий для замены первичных культур с целью усовершенствования технологии выделения вируса.
- Полная валидация новых и модифицированных тестов на основе твердофазного ИФА для обнаружения вируса в альтернативных типах образцов (крови, тканевом эксудате, слюне, мясном соке, фильтровальной бумаге и т.д.).
- Увеличение стабильности компонентов коммерческих диагностических наборов (для молекулярного вирусологического и серологического анализа) для решения проблем с транспортировкой и сроком годности. Для этого можно использовать такие технологии, как лиофилизация, включение в гели и т.д.
- Расширенная валидация новых методов анализа для полевых условий с учетом возможных сценариев в различных регионах мира.
- Разработка и оценка систем для неинвазивного пробоотбора у диких свиней.
- Валидация существующих экспресс-тестов для улучшенного обнаружения и эпидемического надзора за дикими животными Африки.
- Разработка, оценка качества и валидация в полевых условиях коммерческих подтверждающих серологических тестов.
- Стандартизация и валидация тестов на основе твердофазного ИФА для выявления антител против антигенов слюны клещей рода *Ornithodoros* у укушенных животных.
- Изучение влияния и обнаружения низковирулентных изолятов и персистирующих инфекций.

### Вакцины.

- Вирусологические и генетические исследования вируса АЧС с целью обеспечения разработчиков вакцин информацией.
- Определение безопасности экспериментальных живых аттенуированных вакцин.
- Выявление генов в альвеолярных макрофагах, способствующих росту вируса АЧС, в целях улучшения разработки клеточных линий для производства вакцин.
- Получение новых вариантов вируса АЧС с делециями генов в качестве возможных кандидатных вакцин.
- Внутрелабораторные испытания кандидатных вакцин.
- Гармонизация протоколов экспериментов по экспериментальному заражению и интерпретации данных.

- Дальнейшие исследования в области создания эффективных субъединичных вакцин.
- Исследование потенциальных антигенных вакцинных маркеров для дифференциации зараженных и вакцинированных животных.
- Создание приманок для эффективной пероральной вакцинации диких кабанов.
- Изготовление и валидация живых вакцин для парентерального введения.
- Подтверждение концепции безыгольных систем введения новых молекулярных вакцин против АЧС.

#### **Биотерапевтические средства**

- Анализ распределения и экспрессии Ad5-интерферона в организме свиньи как средства быстрой стимуляции защиты от вируса АЧС.

#### **Дезинфектанты**

- Производство дешевых коммерчески доступных дезинфектантов для инактивации вируса АЧС в контаминированных помещениях в условиях ферм и другом окружении.
- Исследование возможности применения дезинфектантов для снижения риска заражения вирусом АЧС от трупов инфицированных животных.

#### **Дикие свиньи и свиные**

- Поддержание исследовательских проектов, направленных на дальнейшее изучение потенциальной роли диких свиней и других представителей семейства свиные как резервуара АЧС.

#### **Клещи-переносчики**

- Исследование способности клещей на территориях, где впервые отмечены вспышки АЧС, стать биологическими переносчиками.
- Определение способности новых изолятов вируса АЧС заражать местных клещей и приводить к персистирующей инфекции у них.
- Необходимо расширить исследования по распространенности аргасовых клещей.

#### **МЕРЫ ПОДГОТОВКИ**

Большинство описанных мер противодействия требуют планирования, подготовки и интеграции в координированные программы по контролю болезни. Важным вопросом является финансирование закупки запасов ветеринарных средств, которые будут использованы в случае реализации плана по экстренному реагированию на вспышку АЧС. GARA рекомендует инвестировать в реализацию исследовательских программ с приоритетом поддержки планов готовности и обеспечения эффективности мер противодействия при профилактике, контроле и ликвидации АЧС.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

АЧС является трансграничным заболеванием животных, угрожающим свиноводству в глобальном масштабе. Хотя данное заболевание изначально было эндемично для Африки, в настоящее время оно плотно укоренилось на Кавказе, в России, Европе, и в настоящий момент угрожает Азии. Наиболее значимой причиной такого распространения, вероятнее всего, является нелегальное перемещение животных и оборот контаминированной свиноводческой продукции. В связи с этим под угрозой находятся все страны, ведущие торговлю свиньями и продуктами свиноводства, включая Европу, Южную и Северную Америки. Кроме того, до сих пор не изучены последствия вспышек АЧС на новых для вируса и экологически уникальных территориях, что осложняет меры контроля. Программы эпиднадзора выступают первой линией защиты против АЧС. Имеются диагностические тесты, которые должны внедряться в практику работы ветеринарных лабораторий. Наибольшей проблемой при контроле вспышек АЧС является отсутствие вакцины, которые могли бы стать ключевым средством контроля данного заболевания.

# ЛИЦА, УЧАСТВОВАВШИЕ В СОСТАВЛЕНИИ ОТЧЕТА

## **Covadonga Alonso (руководитель GARA, 2013-2019)**

Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA, Национальный институт сельскохозяйственных и пищевых исследований и технологий)

Otra. de la Coruña Km 7,5, Madrid, Spain (Отра де ла Корунья, 7,5 км, Мадрид, Испания)

Тел.: +34 91 347 6896

E-mail: calonso@inia.es

## **Marisa Arias, д-р философии**

Директор

Animal Health Research Centre -Centro de Investigación en Sanidad Animal- (Ветеринарный исследовательский центр)

EU Reference Laboratory for African Swine Fever (Референтная лаборатория ЕС по АЧС)

FAO Reference Centre for African Swine Fever (Референтный центр FAO по АЧС)

Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA-CISA, Национальный институт сельскохозяйственных и пищевых исследований и технологий),

Valdeolmos, 28130, Madrid, SPAIN (Вальдеольмос, 28130, Мадрид, Испания)

Тел.: +34 916202300

Факс: +34 916202247

e-mail: arias@inia.es

## **Jonathan Arzt, д-р ветеринарии, д-р философии**

Ветеринар-патолог

Foreign Animal Disease Unit (Отдел экзотических болезней животных)

Plum Island Animal Disease Center (Ветеринарный центр острова Плам)

Agricultural Research Service (ARS, Служба сельскохозяйственных исследований)

United States Department of Agriculture (USDA, Департамент сельского хозяйства США)

P.O. Box 848 Greenport, NY 11944 (П/я 848, Гринпорт, штат Нью-Йорк 11944, США)

Тел. (631) 631-323-3249

jonathan.arzt@ars.usda.gov



**Daniel Beltran-Alcrudo, д-р ветеринарии, д-р философии**

Работник ветеринарной службы (ветеринар-эпидемиолог)

FAO, Regional Office for Europe and Central Asia (Региональный офис FAO в Европе и Центральной Азии)

Mozsár utca 14; 1066 Budapest; Hungary (ул. Мозар 14; 1066 Будапешт, Венгрия)

Тел.: +36-18141262

E-mail: daniel.beltranalcrudo@fao.org

**Amanda Bastos**

University of Pretoria (Преторианский университет)

Pretoria, South Africa (Претория, Южная Африка)

Тел.: +27 12 4204612

E-mail: ADBastos@zoology.up.ac.za

**Richard Bishop, д-р философии**

Старший молекулярный биолог

International Livestock Research Institute (ILRI, Международный исследовательский институт животноводства)

PO Box 30709, Old Naivasha Road, Nairobi 00100, Kenya (П/я 30709, Олд Найваша-роад, Найроби 0100, Кения)

Телефон: 254 20 422 3000 (коммутатор) 422 3359 (прямая линия)

Факс: 254 20 422 3001

Мобильный телефон: 0710 831 851

E-mail : r.bishop@cgiar.org

**Sandra Blome, д-р ветеринарии, д-р философии (зам. директора GARA по науке, 2016-2019)**

Friedrich-Loeffler-Institut Institute of Diagnostic Virology (Институт диагностической вирусологии им. Фридриха-Лёффлера)

Suedufer 10, 17493 Greifswald – Insel Riems, Germany (Зюдюфер 10, 17493 Грайфсвальд – Инзель-Римс, Германия)

Тел.: +49-38351-7-1144

E-mail: sandra.blome@fli.de



**Prof. Fernando Boinas,**

Universidade de Lisboa (Лиссабонский университет)

E-mail: fboinas@fmv.utl.pt

**Manuel V. Borca, д-р ветеринарии, д-р философии**

Foreign Animal Disease Unit (Отдел экзотических болезней животных)

Plum Island Animal Disease Center (Ветеринарный центр острова Плам)

Agricultural Research Service (ARS, Служба сельскохозяйственных исследований)

United States Department of Agriculture (USDA, Департамент сельского хозяйства США)

P.O. Box 848 Greenport, NY 11944 (П/я 848, Гринпорт, штат Нью-Йорк 11944, США)

Тел. (631) 323 3135

Факс: (631) 323 3006

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

**Bruce Carter, д-р ветеринарии**

Руководитель отдела вакцин

Center for Veterinary Biologics Licensing and Policy Development (Центр лицензирования и разработки ветеринарных биологических препаратов)

Animal and Plant Inspection Services (APHIS, Служба инспекции здоровья животных и растений)

United States Department of Agriculture (USDA, Департамент сельского хозяйства США)

510 S. 17th Street, Suite 104, Ames, IA 50010 USA (510 S. 17 стрит, офис 104, Эймс, штат Айова, 50010 США)

Тел.: (515) 232-5785 доб. 141

Факс: (515) 232-7120

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

**Consuelo Carrillo, д-р ветеринарии, д-р философии**

Старший ветеринарный консультант

DSS-FADDL-STATS-VS-NVSL

APHIS-USDA

PIADC, PO Box 848, Greenport, 11944 NY (PIADC, П/я 848, Гринпорт, 11944, штат Нью-Йорк, США)



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

### **Tengiz Chaligava**

National Food Agency (NFA) of the Ministry of Agriculture (MoA, Национальное продовольственное агентство Министерства сельского хозяйства)

6 Marshal Gelovani Ave, Tbilisi, Georgia (пр. Маршала Геловани, 6, Тбилиси, Грузия)

E-mail: Tengiz.Chaligava@nfa.gov.ge

### **Dave Chapman, д-р философии**

ASF Virus group (Группа исследований вируса АЧС)

Institute for Animal Health, Pirbright Laboratory (Ветеринарный институт, Пёрбraitская лаборатория)

Ash Road, Pirbright, Woking, Surrey, GU24 0NF, UK (Эш-роад, Пёрбrait, Уокинг, Суррей, GU24 0NF, Великобритания)

Тел : +44 (0)1483 231084 (прямая линия)

E-mail: Dave.chapman@bbsrc.ac.uk

### **Solenne Costard**

E-mail: scostard@epixanalytics.com

### **Ana De La Torre**

INIA-CISA

Ctra Algete - El Casar s/n (Ктра Альгете –Эль-Казар с/н)

Valdeolmos, Madrid, Spain (Вальдеольмос, Мадрид, Испания)

Тел: +34 91 6202300

E-mail: torre@inia.es

### **Linda Dixon (зам. директора GARA по науке, 2013-2016)**

Head African swine fever virus group (Руководитель группы исследований вируса АЧС)

Head of OIE ASF Reference Laboratory (Руководитель референтной лаборатории МЭБ по АЧС)

The Pirbright Institute (Пёрбraitский институт)

Ash Road, Pirbright, Woking, Surrey, UK (Эш-роад, Пёрбrait, Уокинг, Суррей, Великобритания)



linda.dixon@pirbright.ac.uk

### **Tea Enukidze**

Laboratory of the Ministry of Agriculture (Лаборатория Министерства сельского хозяйства)  
#49, Vaso Godziashvili street, Tbilisi, Georgia (ул. Сосо Годзиашвили, 49, Тбилиси, Грузия)

E-mail: tea.enukidze@lma.gov.ge

### **Eric Etter**

Ветеринар-эпидемиолог

University Of Pretoria / CIRAD (Преторианский университет / CIRAD)

Private Bag X04. Onderstepoort, South Africa (П/я X04, Ондерстепоорт, Южная Африка)

Тел.: +27 (0)12 529 84 67

E-mail: eric.etter@cirad.fr

### **Folorunso O. Fasina, д-р ветеринарии, д-р философии**

Department of Veterinary Tropical Diseases, University of Pretoria & Emergency Center for Transboundary Animal Diseases, Food and Agriculture Organization of the United Nations (Отдел тропических болезней животных, Преторианский университет, и Центр быстрого реагирования по трансграничным болезням животных, Продовольственно-сельскохозяйственная организация ООН)

House H Sida, Ali Hassan Mwinyi Road, Ada Estate (дом Х. Сиды, Али-Гассан Мвиньи роад, Ада Эстейт)

Dar es Salaam, United Republic of Tanzania (Дар-эс-Салам, Объединённая Республика Танзания)

P.O. Box 2 Dar es Salaam, Tanzania (П/я 2, Дар-эс-Салам, Танзания)

Тел.: +255 686 132 852

Факс: +255 22 266 7286

E-mail: folorunso.fasina@fao.org

### **Д-р Jovita Fernández Pinero**

EU- Community Reference Laboratory for African Swine Fever (Референтная лаборатория ЕС по африканской чуме свиней)

Centro de Investigación en Sanidad Animal – Animal Health Research Center- (CISA, Ветеринарный исследовательский центр)



Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA, Национальный институт сельскохозяйственных и пищевых исследований и технологий)

Valdeolmos, 28130, Madrid, Spain (Вальдеольмос, 28130, Мадрид, Испания)

Тел.: +3491602300

fpinero@inia.es

**Д-р Carmina Gallardo Frontaura**

Координатор лаборатории

EU- Community Reference Laboratory for African Swine Fever (Референтная лаборатория ЕС по африканской чуме свиней)

Centro de Investigación en Sanidad Animal – Animal Health Research Center- (CISA, Ветеринарный исследовательский центр)

Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA, Национальный институт сельскохозяйственных и пищевых исследований и технологий)

Valdeolmos, 28130, Madrid, Spain (Вальдеольмос, 28130, Мадрид, Испания)

Тел.: +3491602300

gallardo@inia.es

**Cyril Gerard Gay, д-р ветеринарии, д-р философии (исполнительный секретарь GARA, 2013-2019)**

Старший руководитель национальной программы

Animal Production and Protection (Отдел животноводства и защиты животных)

Agricultural Research Service (Служба сельскохозяйственных исследований)

United States Department of Agriculture (Департамент сельского хозяйства США)

cyril.gay@ars.usda.gov

**Dolores Gavier-Widén, д-р ветеринарии, магистр наук, д-р философии, асс. проф.**

Department of Pathology and Wildlife Diseases (Отдел патологии и заболеваний диких животных)

Руководитель отдела

National Veterinary Institute (SVA), Sweden (Национальный ветеринарный институт, Швеция)

Тел.: +46 (0)18-674215 (рабочий),

+46 703787892 (мобильный)



E-mail: dolores@sva.se

**Douglas Gladue, д-р философии**

Foreign Animal Disease Unit (Отдел экзотических болезней животных)

Plum Island Animal Disease Center (Ветеринарный центр острова Плам)

Agricultural Research Service (ARS, Служба сельскохозяйственных исследований)

United States Department of Agriculture (USDA, Департамент сельского хозяйства США)

P.O. Box 848 Greenport, NY 11944, USA (П/я 848, Гринпорт, штат Нью-Йорк 11944, США)

Тел.: (631) 323 3135

Факс: (631) 323 3006

E-mail: Douglas.Gladue@usda.gov

**Ana Gulbani**

Laboratory of the Ministry of Agriculture (Лаборатория Министерства сельского хозяйства)

#49, Vaso Godziashvili street, Tbilisi, Georgia (ул. Сосо Годзиашвили, 49, Тбилиси, Грузия)

E-mail: tea.enukidze@lma.gov.ge

**Livio Heath (президент GARA, 2013-2016)**

Onderstepoort Veterinary Institute (Ондерстепоортский ветеринарный институт)

South Africa (Южная Африка)

E-mail: heathl@arc.agric.za

**Денис Колбасов, д-р философии, д.в.н.**

Директор ФГБНУ Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии,  
Россия

Покров, Владимирская область, Россия, 601120

Тел./факс: +7-49243-62125

denvk@land.ru

**Marie Frederique LePotier (президент GARA, 2016-2019)**

Anses – Laboratoire de Ploufragan/Plouzané Laboratory (Лаборатория в Плуофраган-Плузане)

Swine virology and immunology unit (Отдел вирусологии и иммунологии свиней)



ZOOPOLE LES CROIX (ЗООПОЛЬ ЛЕ КРУА)

22440 Ploufragan, France (22440, Плуфраган, Франция)

Тел : +33 (0)2 96 01 62 90

Факс: +33 (0)2 96 01 62 94

Email: marie-frederique.lepotier@anses.fr

### **Willie Loeffen**

Central Veterinary Institute (Центральный ветеринарный институт)

Houtribweg 39, Lelystad, The Netherlands (Хаутрибвег 39, Лелистад, Нидерланды)

Тел.: +31 320 238696

E-mail: willie.loeffen@wur.nl

### **Александр Малоголовкин**

E-mail: Malogolovkin@inbox.ru

### **Carlos Martins, д-р ветеринарии, д-р философии**

Координатор ASFRISK

Office C4-102 (Офис C4-102)

Faculdade de Medicina Veterinária (Факультет ветеринарной медицины)

Av. da Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa, Portugal (Аvenida da Universidade Текника, 1300-477 Лиссабон, Португалия)

smartins@fmv.utl.pt

### **Beatriz Martinez**

University of California, Davis (Калифорнийский университет, Дэйвис)

E-mail: beamartinezlopez@ucdavis.edu

### **Charles Masembe (зам директора GARA по финансам, 2016-2019)**

Makerere University (Университет Макерере)

Kampala, Uganda (Кампала, Уганда)

Тел : +256712455987



E-mail: [cmasembe@cns.mak.ac.ug](mailto:cmasembe@cns.mak.ac.ug)

**Д-р Marta Martinez Aviles, UCM-CISA**

Universidad Complutense, Facultad de Veterinaria (Мадридский университет Комплутенсе, ветеринарный факультет)

Avda. Puerta de Hierro, 28040 Madrid, Spain (Аvenida Пуэрто де Йерра, 28040, Мадрид, Испания)

и Centro de Investigación en Sanidad Animal – Animal Health Research Center- (CISA, Ветеринарный исследовательский центр)

Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA, Национальный институт сельскохозяйственных и пищевых исследований и технологий)

Valdeolmos, 28130, Madrid, Spain (Вальдеольмос, 28130, Мадрид, Испания)

Тел.: +3491602300

[marta@sanidadanimal.info](mailto:marta@sanidadanimal.info)

**Ioseb Menteshashvili**

National Food Agency (NFA) of the Ministry of Agriculture (MoA, Национальное продовольственное агентство Министерства сельского хозяйства)

6 Marshal Gelovani Ave, Tbilisi, Georgia (пр. Маршала Геловани, 6, Тбилиси, Грузия)

E-mail: [stkhelia@ch2m.com](mailto:stkhelia@ch2m.com)

**Gerald Misinzo**

Sokoine University of Agriculture (Сельскохозяйственный университет им. Сокойне)

PO Box 3019, Morogoro, Tanzania (П/я 3019, Морогоро, Танзания)

Тел: +255767058805

E-mail: [gmsinzo@gmail.com](mailto:gmsinzo@gmail.com)

**Imbi Nurmoja**

Estonian Veterinary and Food Laboratory (Эстонская ветеринарно-продовольственная лаборатория)

Kreutzwaldi 30, Tartu, Estonia (Крейцвальди 30, Тарту, Эстония)

E-mail: [imbi.nurmoja@vetlab.ee](mailto:imbi.nurmoja@vetlab.ee)



**Mary-Louise Penrith, д-р философии, доктор наук, бакалавр ветеринарных наук (с отличием)**

Внештатный профессор

Department of Veterinary Tropical Diseases (Кафедра тропических болезней животных)

Faculty of Veterinary Science (Факультет ветеринарных наук)

University of Pretoria (Преторианский университет)

South Africa (Южная Африка)

E-mail: marylouise@vodamail.co.za

**Tamas Petrovic, д-р ветеринарии, магистр наук, д-р философии.**

Scientific Veterinary Institute "Novi Sad" (Ветеринарный исследовательский институт Нови-Сад)

Зам. директора по науке

Rumenacki put 20, 21000 Novi Sad, Serbia (Руменачки пут, 20, 21000, Нови-Сад, Сербия)

Тел.: + 381 21 4895 321;

Мобильный тел.: +381 64 818 5410

E-mail: tomy@niv.ns.ac.rs

**Fernando Rodriguez**

E-mail: fernando.rodriguez@irta.cat

**Luis Rodriguez, д-р ветеринарии, д-р философии**

Ведущий научный сотрудник

Foreign Animal Disease Research Unit (Научно-исследовательский отдел экзотических болезней животных)

Agricultural Research Service (Служба сельскохозяйственных исследований)

United States Department of Agriculture (Департамент сельского хозяйства США)

Orient Point, New York (Ориент-Пойнт, Нью-Йорк, США)

luis.rodriguez@ars.usda.gov

**Guillermo Risatti, д-р ветеринарии, д-р философии**

University of Connecticut (Коннектикутский университет)



61 N. Eagleville Road, Unit 3089, Storrs, CT, USA (61 Н. Иглвилл-роад, стр. 3089, Сторрс, штат Коннектикут, США)

Тел: +1 860 486 6150

E-mail: guillermo.risatti@uconn.edu

**Bob Rowland, д-р философии (зам. директора GARA по финансам, 2013-2016)**

Kansas State University (Канзасский государственный университет)

1800 Denison Avenue, Manhattan, Kansas, USA (1800 Денисон-авеню, Манхэттен, Канзас, США)

E-mail: browland@vet.k-state.edu

**Karl Stahl**

National Veterinary Institute (SVA, Национальный ветеринарный институт)

Uppsala, Sweden (Уппсала, Швеция)

E-mail: karl.stahl@sva.se

**Hermann Unger**

IAEA

Vienna, Austria (Вена, Австрия)

E-mail: h.unger@iaea.org

**Chris Upton, д-р философии**

Biochemistry and Microbiology, University of Victoria, Canada, Victoria, BC (Факультет биохимии и микробиологии, Викторианский университет, Виктория, Британская Колумбия, Канада)

Веб-страница исследований: [www.virology.ca](http://www.virology.ca)

Домашняя страница: [www.virology.ca/node/333](http://www.virology.ca/node/333)

E-mail : [cupton@uvic.ca](mailto:cupton@uvic.ca)

**Д-р Pedro José Sánchez-Cordón,**

Fac. Veterinaria, University of Cordoba, Spain (Ветеринарный факультет, Кордовский университет, Испания)

E-mail: [an2sacop@uco.es](mailto:an2sacop@uco.es)



**Isabel Mínguez Tudela, д-р ветеринарии, д-р философии (посвящается памяти)**

Научный сотрудник

Directorate General Research, European Commission (Дирекция по общим исследованиям, Европейская комиссия)

Office SDME 8/96, 1049 Brussels, BELGIUM (Офис SDME 8/96, 1049 Брюссель, БЕЛЬГИЯ)

**Д-р Yolanda Revilla-Novella, д-р философии**

Department of Immunology and Virology (Отдел иммунологии и вирусологии)

Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (Центр молекулярной биологии им. Северо Очоа)

C/Nicolás Cabrera 1 Campus de la Universidad Autónoma de Madrid (С/Николас Кабрера, 1 кампус Автономного Мадридского университета)

28049-Madrid, Spain (28049 Мадрид, Испания)

Тел. +34-911964401

yrevilla@cbm.uam.es

**Juergen A. Richt, д-р ветеринарии, д-р философии**

Заслуженный риджент-профессор

Kansas State University (Канзасский государственный университет)

Diagnostic Medicine/Pathobiology Dept. (Факультет диагностической медицины/патобиологии)

College of Veterinary Medicine (Колледж ветеринарной медицины)

K224B Mosier Hall, Manhattan, KS 66506-5601 (K224B Мосье-Холл, Манхэттен, штат Канзас, США 66506-5601)

Тел.: 785-532-4408

E-mail: <mailto:dclouser@vet.k-state.edu>

**Д-р Paloma Rueda, д-р философии**

Руководитель научно-исследовательского отдела

INGENASA (Inmunología y Genética Aplicada S.A.)

Av/Institución Libre de Enseñanza, 41, 28037-Madrid, Spain (Аvenida Инститución Либре де Энсенанца, 41, 28037, Мадрид, Испания)

Тел.: +34-913680501

[prueda@ingenasa.com](mailto:prueda@ingenasa.com)



**Д-р Patricia Sastre, д-р философии**

Research Department (Исследовательский отдел)

INGENASA (Inmunología y Genética Aplicada S.A.)

Av/Institución Libre de Enseñanza, 41, 28037-Madrid, Spain (Аvenida Инститución Либре де Энсенанца, 41, 28037, Мадрид, Испания)

Тел.: +34-913680501

E-mail: psastre@ingenasa.com

**Lucilla Steinaa,**

Главный научный сотрудник

Animal and Human Health Program (Ветеринарно-медицинская программа)

Biosciences Directorate (Дирекция по биологическим наукам)

International Livestock Research Institute (Международный исследовательский институт животноводства)

Nairobi, Kenya (Найроби, Кения)

e-mail: l.steinaa@cgiar.org

**Nino Vepkhvadze**

Laboratory of the Ministry of Agriculture (Лаборатория министерства сельского хозяйства)

49, Godziashvili Street, Tbilisi, Georgia (49, ул. Годзиашвили, Тбилиси, Грузия)

E-mail: stkhelia@ch2m.com

**Arvo Viltrop**

Профессор ветеринарной эпидемиологии

Institute of Veterinary Medicine and Animal Science (Институт ветеринарной медицины и зоотехнии)

Estonian University of Life Sciences, Kreutzwaldi 62, Tartu 51014 (Эстонский университет медико-биологических наук, Крейцвальди, 62, Тарту, 51014)

E-mail: [arvo.viltrop@emu.ee](mailto:arvo.viltrop@emu.ee)

Тел: +372 7313210, +372 5033229

**Проф., д-р José-Manuel Sánchez-Vizcaíno, д-р ветеринарии, д-р философии**



Профессор ветеринарии

Director del Laboratorio de Referencia de la OIE (Директор референтной лаборатории МЭБ)

Universidad Complutense Facultad de Veterinaria (Мадридский университет Компутенсе, ветеринарный факультет)

Avda. Puerta de Hierro, 28040 Madrid, Spain (Авенида Пуэрто де Йерро, 29040, Мадрид, Испания)

[jmvizcaino@visavet.ucm.es](mailto:jmvizcaino@visavet.ucm.es)

**Д-р David Williams, д-р философии**

Руководитель группы лабораторной диагностики эмерджентных болезней

CSIRO Australian Animal Health Laboratory (Австралийская ветеринарная лаборатория CSIRO)

5 Portarlington Road, Geelong, Victoria, Australia 3220 (5 Портарлингтон-роад, Джилонг, Виктория, Австралия, 3220)

Тел.: +61-3-5227-5364

[d.williams@csiro.au](mailto:d.williams@csiro.au)

**Novakim Zakaryan**

Institute of Molecular Biology (Институт молекулярной биологии)

7 Nasratyan, St. Yerevan, Armenia (ул. Асратян, 7, Ереван, Армения)

E-mail: [h\\_zakaryan@mb.sci.am](mailto:h_zakaryan@mb.sci.am)

**Laszlo Zsak, Д-Р ВЕТЕРИНАРИИ, д-р философии (на пенсии)**

Plum Island Animal Disease Center (Центр ветеринарии острова Плам)

Agricultural Research Service (ARS, Служба сельскохозяйственных исследований)

United States Department of Agriculture (USDA, Департамент сельского хозяйства США)

P.O. Box 848 Greenport, NY 11944 (П/я 848, Гринпорт, штат Нью-Йорк 11944, США)



## БИБЛИОГРАФИЯ

- 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.

Argilaguuet J.M., Pérez-Martín E., Nofrarías 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

Argilaguuet 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.

Backer J.A., Vrancken R., Neyts J., Goris N. (2013). The potential of antiviral agents to control classical swine fever: a modelling study. *Antiviral Res.* Sep;99(3):245-50. doi: 10.1016/j.antiviral.2013.06.013.

Ballester, M., Rodriguez, 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., Martinez 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, Vydelingum 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, Vydelingum 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.
- Bournsnel 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
- Brown, A.A., Penrith, M.L., Fasina, F.O., Beltrán-Alcrudo, D. (2018). The African swine fever epidemic in West Africa, 1996-2002. *Transbound Emerg Dis*. 65(1):64-76.
- 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, Borca 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., I. Galindo, B. Hernández, J.I. Quetglás, I. Dalmau-Mena and C. Alonso. 2012.

- Endosomal maturation, Rab7 GTPase and Phosphoinositides in African Swine Fever Virus entry. PLoS ONE 7(11): e48853. doi: 10.1371/journal.pone.0048853
- 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. doi: 10.1128/JVI.02694-15.
- 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
- Davies K., Goatley LC., Guinat C., Netherton CL., Gubbins S., Dixon LK., Reis AL. (2017). Survival of African Swine Fever Virus in Excretions from Pigs Experimentally Infected with the Georgia 2007/1 Isolate. *Transbound Emerg Dis.*;64(2):425-431. doi: 10.1111/tbed.12381.
- 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 JJG (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, Fanquet 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
- Fabregas, J., Garcia, D., Fernandez-Alonso, M., Rocha, A.I., Gomez-Puertas, P., Escribano, J.M., Otero, A., Coll, J.M. 1999. In vitro inhibition of the replication of haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) and African swine fever virus (ASFV) by extracts from marine microalgae. *Antiviral Research* 44 (1), 67–73.
- Fasina FO, Lazarus DD, Spencer BT, Makinde AA, Bastos AD (2012). Cost implications of African swine fever in smallholder farrow-to-finish units: economic benefits of disease prevention through biosecurity. *Transbound Emerg Dis.* 59(3):244-55.
- 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.
- Galindo I., B. Hernández, J. Berna, J. Fenoll, J.L. Cenis, J.M. Escribano and C. Alonso. (2011). Comparative inhibitory activity of stilbenes resveratrol and oxyresveratrol on African swine fever virus replication *Antiviral Research* 91: 57-63.
- 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.
- Hakobyan A., Galindo I., Nañez A., Arabyan E., Karalyan Z., Chistov A. A., Streshnev P.P., Korshun V.A., Alonso C. and Zakaryan H. Rigid amphipathic fusion inhibitors demonstrate antiviral activity against African swine fever virus. *Journal General Virology* 99:148-156 doi: 10.1099/jgv.0.000991
- 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

Howey E.B., O'Donnell Ferreira H., Borca M.V., Arzt J. (2013). Pathogenesis of highly virulent African swine fever virus in domestic pigs exposed via intraoropharyngeal, intranasopharyngeal, and intramuscular inoculation, and by direct contact with infected pigs. *Virus Research* 178 (2013) 328– 339

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

Jaing C, Allen J, Thissen JB, Rowland RR, Williams D. (2016). Whole transcriptome analysis of 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., Kasajja, 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 Atuhair 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
- Moss A. (2001) Tenacity of viral infectious agents in biogenic waste during co-fermentation with manure. Inaugural dissertation to obtain the doctorate degree at the Department of Veterinary Medicine of Justus Liebig University Giessen; submitted by Andreas Moss, veterinarian from Tübingen, casting 2001, ISBN 3-933953-87-1
- 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 small-holder 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, M.-L., Thomson, G.R., Bastos, A.D.S, Phiri, O.C., Lubisi, B.A., Botha, B., Du Plessis, E.C., Macome, F., Pinto, F., Botha, B. and Esterhuysen, J. (2004). An investigation into natural resistance to African swine fever in domestic pigs from an endemic area in southern Africa. *Rev. sci. tech., Off. int. Épiz.* 23: 665–677.
- 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
- Quetglas J.I., Hernaez B., Galindo I., Muñoz-Moreno R., Cuesta-Geijo M.A. and Alonso C. 2012. Small Rho GTPases and cholesterol biosynthetic pathway intermediates in African swine fever virus infection. *Journal of Virology* Feb;86(3):1758-67. doi: 10.1128/JVI.05666-11.
- 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.
- Quembo, C. J., Jori, F., Vosloo, W., Heath, L. (2018) Genetic characterization of African swine fever virus isolates from soft ticks at the wildlife/domestic interface in Mozambique and identification of a novel genotype. *Transbound Emerg Dis*, 65:420–431.
- 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 $\Delta$ 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

Sánchez-Vizcaíno, J.M., Mur, L., Gomez-Villamandos, J.C. & Carrasco, L. (2015a). An update on the epidemiology and pathology of African swine fever. *J. Comp. Path.*, 152, 9-21.

Sanchez-Vizcaino, J. M., Mur, L., Bastos, A. D. & Penrith, M. L. (2015b) 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. (2016a) 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. (2016b) 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
- Turner C and Williams S.M. (1999). Laboratory-scale inactivation of African swine fever virus and swine vesicular disease virus in pig slurry. *Journal of Applied Microbiology* 1999, 87, 148–157
- Utenthal 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.
- 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.
- Xia Y, Xie Y, Yu Z, Xiao H, Jiang G, Zhou X, Yang Y, Li X, Zhao M, Li L, Zheng M, Han S, Zong Z, Meng X, Deng H, Ye H, Fa Y, Wu H, Oldfield E, Hu X, Liu W, Shi Y, Zhang Y. (2018). The Mevalonate Pathway Is a Druggable Target for Vaccine Adjuvant Discovery. *Cell* 175: 1059-73.

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.

