

非洲猪瘟疫苗研究进展

戈胜强[#], 吴晓东[#], 张志诚, 张永强, 赵永刚, 王志亮^{*}

(中国动物卫生与流行病学中心, 青岛 266032)

摘要: 非洲猪瘟 (ASF) 是由非洲猪瘟病毒引起的、以软蜱为传播媒介的猪的急性、热性、高度接触性传染病。该病毒主要在网状内皮细胞和单核巨噬细胞中复制, 造成细胞凋亡, 严重影响宿主的免疫系统。该病虽最早见于 1921 年, 但由于病毒基因组大, 基因型多且非常容易变异等客观原因, 造成至今无有效的疫苗面世。国外 ASF 疫苗研发一直在开拓前行, 而国内大多数文献只进行了简单的描述, 没有全面展示 ASF 疫苗的研究进展, 为此作者就 ASF 疫苗的相关研究进展进行综述, 以期为我国 ASF 的疫苗研究提供参考。

关键词: 非洲猪瘟; 细胞免疫; 疫苗

中图分类号: S858.285.3

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2016)01-0010-06

Progress in Development of African Swine Fever Vaccine

GE Sheng-qiang[#], WU Xiao-dong[#], ZHANG Zhi-cheng, ZHANG Yong-qiang,

ZHAO Yong-gang, WANG Zhi-liang^{*}

(China Animal Health and Epidemiology Center, Qingdao 266032, China)

Abstract: African swine fever (ASF) is an acute, febrile, highly contagious, tick borne disease caused by African swine fever virus. The virus mainly replicate in the reticuloendothelial cells and mononuclear macrophage, resulting in cell apoptosis and causing serious impact on the immune system of the host. Even though the disease was first described in 1921, there is still no efficient vaccine available in the market because of the big virus genome, multi genotype and easily mutation. Even so, foreign scientists keep researching on the development of ASF vaccine. Although there are Chinese articles on ASF had been published, most of these articles provided brief introductions of the disease without fully discussed the development associated with ASF vaccine. Here, in order to provide reference to the research of ASF vaccine, we reviewed the current research progress of ASF vaccine.

Key words: African swine fever; cellular immunity; vaccine

非洲猪瘟 (African swine fever, ASF) 于 1921 年在肯尼亚首次报道^[1], 但该病毒实际早已在东非和南非的疣猪 (warthogs) 和波斯锐绿蜱 (tampan) 中循环存在许多世纪^[2]。自该病公开报道以后, 其在非洲大陆快速蔓延, 并于 1957 年首次传入欧洲的葡萄牙, 之后开始在西欧广泛传播。西班牙 (1960)、法国 (1964)、意大利 (1967)、前苏联 (1977)、马耳他

(1978)、比利时 (1985)、荷兰 (1986) 等欧洲国家随后均有疫情报道。2007 年, 非洲猪瘟传播至欧亚接壤的高加索地区并很快传至格鲁吉亚、亚美尼亚、阿塞拜疆以及俄罗斯地区, 且呈现出继续蔓延的趋势。近几年的疫情监测显示, 非洲猪瘟已经在俄罗斯成为地方流行性疾病, 特别是俄罗斯境内野猪的潜在感染使得该病在俄罗斯快速根除的可能性很小。由

收稿日期: 2015-03-04

作者简介: 戈胜强 (1982-), 男, 山东青岛人, 博士, 主要从事动物疫病病原分子生物学研究, E-mail: geshengqiang@cahec.cn; 吴晓东, Tel: 0532-87839188。二人并列第一作者

* 通信作者: 王志亮, 研究员, E-mail: wangzhiliang@cahec.cn

于我国与俄罗斯接壤,且与非洲的人员、贸易交流日益频繁,此病传入我国的风险越来越大。虽然国外有根除该病的成功案例,但是面对国内不规范的养殖环境,复杂的疫情状况和落后的饲养管理水平等,使得疫苗仍为我国预防该病的最佳方案。

ASFV 是非洲猪瘟病毒科非洲猪瘟病毒属中的唯一成员,而且是唯一的虫媒 DNA 病毒。在 1982 年的国际病毒分类委员会第 4 次报告中因 ASFV 与虹彩病毒科的形态相似,将 ASFV 划至虹彩病毒科。但随后发现其 DNA 结构和复制方式明显不同于虹彩病毒科内的其他成员,而与痘病毒相似,故在 1991 年的国际病毒分类委员会第 5 次报告中将其划入痘病毒科内,但置于该科的脊椎动物痘病毒亚科及昆虫痘病毒亚科之外。进一步研究发现 ASFV 的复制策略与痘病毒也有差异,且具有介于痘病毒和虹彩病毒之间的特征,所以在 2000 年的国际病毒分类委员会第 7 次报告中将其归属于非洲猪瘟病毒科,而且是其中唯一的成员。ASFV 颗粒直径约 200 nm,衣壳呈二十面体对称,具有复杂的多层结构。病毒基因组为一条线性双链 DNA 分子,170~190 kb,可编码约 200 种蛋白质。由于 ASFV 的抗感染机制十分复杂、基因型多(22 个基因型)且病毒容易变异,故 ASF 疫苗一直未研究成功,但国外科学家一直在不断尝试。我国已有大量文献介绍非洲猪瘟及防控^[3],但是针对该病疫苗的介绍还较简单,没有全面展示该病疫苗的研究进展,为此作者就 ASF 疫苗的相关研究进展进行综述,以期为我国 ASF 的疫苗研究提供参考。

1 灭活疫苗

灭活疫苗作为最经典的疫苗研制方式,在非洲猪瘟发现之后即已开始研发,但早期落后的灭活工艺无法取得满意的制苗效果。如经加热^[1]、复方碘溶液、甲苯、福尔马林^[4]、结晶紫^[5-6]、 β -丙内酯^[7-8]、乙酰氯丙啉和缩水甘油醛^[8]处理的 ASF 灭活疫苗虽部分能刺激猪产生抗体,但即使借助佐剂仍无法抵御 ASFV 的攻击。20 世纪 60 年代后的研究也证实 ASF 灭活疫苗作用微弱^[8-9]或仅在某些病例中发挥部分保护作用^[7],如用 ASFV 接种的肺泡巨噬细胞悬浮液制备的灭活疫苗免疫后无保护作用^[10],ASFV 感染猪的脾组织匀浆经弗氏完全佐剂乳化制备的灭活疫苗仅可以使 ASF 同源毒株的攻毒保护率达到 70%,且所有存活猪都表现出临床症状^[11],

该试验的第二次验证仍只能达到 50% 以上的保护率^[12]。由于灭活疫苗自身固有的缺陷,很难刺激先天免疫系统诱导产生高水平的细胞免疫,而随着 ASF 研究的不断深入,科学家逐渐认识到细胞免疫对于 ASFV 感染的重要作用,因此科学家又希望通过添加佐剂或免疫增强剂来提高 ASF 灭活疫苗的功效,刺激机体产生合适的细胞免疫反应^[12]。但最新的研究结果证实,即使使用最新的佐剂,如 PolygenTM或 Emulsigen[®]-D 等,ASF 灭活疫苗仍无法达到有效保护的目的^[13]。

2 弱毒疫苗

早在 1957 年,科学家即认识到感染低毒力 ASFV 存活下来的猪可以抵御同基因型强毒株的攻击^[5]。随后,在 20 世纪 60 年代,大量的试验证实 ASFV 经细胞多次传代培养后可以使其毒力下降^[14-18],接种家猪不再产生致死性感染,这使得人们相信制备 ASF 弱毒疫苗的可能性很大。1963 年, R. J. Manso 等证实通过猪骨髓细胞传代致弱的 ASF 弱毒疫苗可以抵御强毒株攻击^[15]。此弱毒疫苗随后在葡萄牙和西班牙进行田间试验,但却造成了灾难性的后果,免疫后的许多猪出现了肺炎、运动障碍、皮肤溃疡、流产和死亡等疫苗免疫副作用。特别是在葡萄牙,550 000 头猪免疫后有 128 684 头出现免疫副作用,且出现大量病毒携带猪。据推测,随后出现的 ASF 疫情中分离的弱毒株可能也来自此次疫苗接种^[19-20]。这种现象也与相关实验室报道的攻毒结果相似^[19],后者证实 ASF 弱毒疫苗接种后,即使没有接种强毒株,大多数的免疫动物仍会出现慢性感染,且最终死亡率达到 10%~50%。很多病毒携带者虽能在长时间内保持健康状态,但大多数最终发展为慢性肺炎或因急性发作而死亡。最终的死亡率与弱毒返强的程度、实验动物的敏感程度和接种动物的压力状况等有密切关系。有试验发现,当 ASF 弱毒疫苗接种猪暴露于口蹄疫、牛瘟或猪瘟的环境压力下时,相比较无此压力的 ASF 弱毒疫苗接种猪,在面对强毒攻击时暴露在压力之下的猪更易死亡^[21]。

由于此次失败的临床经验,ASF 再无弱毒疫苗进行过田间试验^[22]。虽然 ASF 弱毒疫苗的田间试验停滞不前,但是关于此方向的研究仍在继续。通过自然筛选或细胞传代致弱技术, P. J. Wilkinson (1981 年)^[23], G. F. Ruiz 等 (1986 年)^[24], A. Leitão

等(2001年)^[25], F. S. Boinas等(2004年)^[26]和 K. King等(2011年)^[27]均证实 ASF 弱毒疫苗可以抵御强毒株的攻击。为进一步研究 ASFV 致弱的分子机制, D. A. Chapman等^[28]对葡萄牙分离的基因 I 型自然弱毒株 OURT88/3 进行了全基因测序, 经与西非强毒株 Benin 97/1 和西班牙 Vero 细胞传代适应株 BA71V 对比分析后发现, OURT88/3 和 BA71V 均出现了 8~10 kb 大小片段的基因丢失。这个片段可以表达 5 个拷贝的多基因家族 (multi-gene family, MGF) 360 和 2 个拷贝的多基因家族 505/530。这 2 个多基因家族的丢失可以增加 I 型干扰素的产生和增强干扰素的反应强度^[29]。OURT88/3 同时还在 EP402R 和 EP153R 基因处发生移码突变, 这 2 个基因表达的蛋白质经证实也与免疫逃避有关^[30-31]。这些基因的丢失和中断可能在 ASFV 致弱或增强机体免疫水平方面发挥重要作用。

随着全基因测序技术的不断成熟以及 ASFV 基因功能的不断探索, 通过基因敲除的方式制备 ASF 弱毒疫苗的可能性越来越大。目前最常用的技术手段是利用溶斑识别和筛选技术 (lysis plaque identification and selection) 进行基因突变^[32]。由于基因敲除的变化不是点突变, 因此毒力更稳定, 毒力返强概率也更小。对于 ASFV, 目前备受关注的基因主要是那些删除后会导病毒毒力降低或增加机体免疫反应的功能基因^[33]。例如, 多基因家族 360 和 530 里面的基因^[29], 参与到核苷酸代谢的胸苷激酶基因 (thymidine kinase, TK)^[33] 和 B119L 或 9GL 基因^[34]。这些基因删除后通过降低病毒在巨噬细胞的繁殖能力进而达到降低病毒毒力的目的。还有些基因虽然删除后不能降低病毒在巨噬细胞的繁殖能力, 但也能减低病毒在猪体内的毒力。例如, 删除 DP71L 基因 (也命名为 114L、NL、NLS) 和 DP96R (也命名为 UK) 毒力基因也可以降低病毒的毒力^[35-36]。相反, 有一些涉及免疫逃避的基因被删除后不能降低病毒毒力。例如, 编码 A238L 蛋白^[37]、CD2v 蛋白^[30]、C-型凝集素 (C-type lectin)^[38] 和细胞凋亡抑制因子的基因被删除后并没有降低病毒在猪体内的毒力, 但仍有希望作为弱毒疫苗的删除基因, 因为这些基因删除后可能会对猪产生适当的保护反应。

3 亚单位疫苗

ASF 亚单位疫苗的研究策略主要是将具有中

和表位的非洲猪瘟病毒保护性抗原基因在原核或真核细胞中表达, 并将产生的蛋白质或多肽递呈给抗原递呈细胞, 以诱导产生高滴度的抗非洲猪瘟病毒的中和抗体。ASFV 编码的结构蛋白很多, 但恢复期猪血清显示 P72、P30 和 P54 为感染过程中引起体液免疫应答最重要的 3 个抗原蛋白^[39-44]。针对 P72 和 P54 的抗体可以阻止病毒吸附, 针对 P30 的抗体可以阻止病毒内吞^[42]。目前大量的研究已经证实将这三个蛋白质作为 ASF 亚单位疫苗具有一定的局限性。P. Gómez-Puertas 等采用重组杆状病毒表达的 P30 和 P54 蛋白制备的疫苗仅能提供 50% 的保护^[45], M. G. Barderas 等表达的 P54/30 重组蛋白质仅可以延缓临床症状的出现和降低病毒血症的滴度^[46], J. G. Neilan 等证实将 P30、P54 和 P72 免疫后不能提供免疫保护, 仅能延缓临床症状出现时间和降低病毒血症水平^[47]。针对其他 ASFV 蛋白质的研究也证实了单纯的将蛋白质作为疫苗使用的不足, 如将 2 只 ASFV 血凝素蛋白免疫猪与 ASFV 强毒感染猪混合饲养, 1 只死亡, 1 只存活^[48]; 杆状病毒表达的 CD2v 蛋白只能提供部分保护^[49]; 经抗原分析后人工合成的 ASFV 肽段只能延缓病程^[50]; 病毒结合蛋白 P12 的抗血清在体外试验中不能降低病毒感染^[42], 不能阻止 ASFV 与易感细胞结合或中和病毒等^[51-52]。这些试验说明面对 ASFV 众多的抗原结构蛋白和复杂的免疫刺激过程, 单纯依靠一种或几种蛋白质很难达到免疫预防效果。

4 DNA 疫苗

DNA 疫苗又称核酸疫苗, 是指将编码某种抗原蛋白质的重组真核表达载体直接注射到动物体内, 使外源基因在宿主细胞的表达系统内合成抗原蛋白质, 诱导宿主产生针对该抗原蛋白质的特异性的体液免疫和细胞免疫应答, 以达到预防和治疗疫病的目的。作为新一代的疫苗研制方向, ASFV 的相关研究也已经开始。J. M. Argilaguet 等将 P30 和 P54 连入真核表达质粒 pCMV-PQ, 结果该 DNA 疫苗免疫猪后无法抵御强毒株的攻击^[53]。随后, 该实验室又进一步将 ASFV 血凝素蛋白基因和泛素基因 (ubiquitin) 连入上述 DNA 疫苗中, 结果仍不能达到完全保护的功效^[54]。为进一步研究能刺激 CD8⁺ T 细胞的潜在免疫保护区, A. Lacasta 等通过表达文库 (expression library) 构建了 4 029 个表达质粒 (ASFV^{U^bib}) 并对其进行了免疫攻毒保护试验, 结果

保护率仍只达到 60%^[55]。虽然目前研制的 DNA 疫苗还不能抵御强毒攻击,但 ASFV^{U_{lib}}免疫攻毒后存活的猪无排毒现象,这个研究结果标志着距离开发出有效的 ASF 疫苗又迈出了一大步。相信随着 ASFV 基因组及保护性抗原的不断深入研究以及表达载体的不断改造优化,DNA 疫苗一定会在未来 ASF 疫苗市场上占据一席之地。

5 其他新型疫苗

复制缺陷型病毒疫苗是近些年倍受关注的新型疫苗研制方向。ASF 复制缺陷型疫苗是采用基因工程方法,将非洲猪瘟弱毒株复制过程中的一些必需基因进行缺失,使其只有在提供复制必需基因的辅助细胞系中才能进行有效复制,在感染动物后不能进行有效复制,故该疫苗毒株最大程度保留了病毒的原始状态,保持了完整病毒颗粒所具有的免疫原性且在感染动物中不会产生排毒等免疫副作用。虽然目前还无更详细的专业报道,但有报道称西班牙马德里 Severo Ochoa 分子生物学中心(CBMSO)的研究人员已经开始研发^[56],其实验室也于 2012 年将通过抑制 *pp220*、*pp62* 和 *pB438L* 基因产生 ASF 复制缺陷性病毒的研究申请专利^[57]。

参考文献(References):

[1] MONTGOMERY R E. On a form of swine fever occurring in British East Africa(Kenya Colony)[J]. *J Comp Pathol*, 1921, 34: 159-191.

[2] PENRITH M L. History of "swine fever" in Southern Africa[J]. *J S Afr Vet Assoc*, 2013, 84(1): 1-6.

[3] 张志诚, 黄 炯, 包静月, 等. 基于“风险邻近”的全球尺度非洲猪瘟发生状况及其输入风险模型构建[J]. 畜牧兽医学报, 2011, 42(1): 82-91.
ZHANG Z C, HUANG J, BAO J Y, et al. Risk approximate based studies on the current status of Global pattern of African swine fever and it's import risk mode [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2011, 42(1): 82-91. (in Chinese)

[4] WALKER J. East African swine fever[D]. German: The University of Zurich, 1933.

[5] DE K G, ROBINSON E M, KEPPEL J J G. Swine fever in South African [J]. *Onderstepoort J Vet Sci Anim Ind*, 1940, 14: 31-93.

[6] DETRAY D E. Persistence of viremia and immunity in African swine fever [J]. *Am J Vet Res*, 1957, 18 (69): 811-816.

[7] DETRAY D E. African swine fever [J]. *Adv Vet Sci*, 1963, 8: 299-333.

[8] STONE S, SHESS W R. Antibody response to inactivated preparations of African swine fever virus in pigs [J]. *Am J Vet Res*, 1967, 28(123): 475-481.

[9] MEBUS C A. African swine fever [J]. *Adv Virus Res*, 1988, 35: 251-269.

[10] FORMAN A J, WARDLEY R C, WILKINSON P J. The immunological response of pigs and guinea pigs to antigens of African swine fever virus [J]. *Arch Virol*, 1982, 74(2-3): 91-100.

[11] BOMMELI W, KIHM U, EHRENSPERGER F. FAO/CEC expert consultation on African swine fever research [M]. Preliminary study on immunization of pigs against African swine fever. Sassari (Italy), 1981: 217-223.

[12] KIHM U, ACKERMANN M, MUELLER H, et al. African swine fever [M]. Approaches to Vaccination. US: Springer, 1987: 127-144.

[13] BLOME S, GABRIEL C, BEER M. Modern adjuvants do not enhance the efficacy of an inactivated African swine fever virus vaccine preparation [J]. *Vaccine*, 2014, 32(31): 3879-3882.

[14] MALMQUIST W A. Propagation, modification, and hemadsorption of African swine fever virus in cell cultures [J]. *Am J Vet Res*, 1962, 23: 241-247.

[15] MANSO R J, NUNES P J L, LOPEZ F F, et al. Vaccination against ASF [J]. *Bull Off Int Epizoot*, 1963, 60: 921-937.

[16] HESS W R, COX B F, HEUSCHELE W P, et al. Propagation and modification of ASF virus in cell cultures [J]. *Am J Vet Res*, 1965, 26: 141-146.

[17] MALMQUIST W A. Serologic and immunologic studies with African swine fever virus [J]. *Am J Vet Res*, 1963, 24: 450-459.

[18] COGGINS L, MOULTON J E, COLGROVE G S. Studies with hinde attenuated African swine fever virus [J]. *Cornell Vet*, 1968, 48(4): 525-540.

[19] HESS W R. African swine fever virus [J]. *Virol Monogr*, 1971, 9: 1-33.

[20] BECKER Y. African swine fever [M]. Holland: Kluwer Academic Publishers, 1987.

[21] DELAY P D, SHARMAN E C. The effect of stressor viruses on pigs inoculated with attenuated African swine fever virus [J]. *Bull Off Int Epizoot*, 1965, 63 (5): 733-749.

[22] DIXON L K, ABRAMS C C, CHAPMAN D D, et al.

- Prospects for development of African swine fever virus vaccines [J]. *Dev Biol (Basel)*, 2013, 135: 147-157.
- [23] WILKINSON P J. Proceedings of a CEC/FAO research seminar held in Sassari[M]. Sassari: Commission of the European Communities, 1981.
- [24] RUIZ GONZALVO F, CABALLERO C, MARTINEZ J, et al. Neutralization of African swine fever virus by sera from African swine fever-resistant pigs[J]. *Am J Vet Res*, 1986, 47(8): 1858-1862.
- [25] LEITÃO A, CARTAXEIRO C, COELHO R, et al. The non-haemadsorbing African swine fever virus isolate ASFV/NH/P68 provides a model for defining the protective anti-virus immune response[J]. *J Gen Virol*, 2001, 82(Pt3): 513-523.
- [26] BOINAS F S, HUTCHINGS G H, DIXON L K, et al. Characterization of pathogenic and non-pathogenic African swine fever virus isolates from *Ornithodoros erraticus* inhabiting pig premises in Portugal [J]. *J Gen Virol*, 2004, 85(Pt8): 2177-2187.
- [27] KING K, CHAPMAN D, ARGILAGUET J M, et al. Protection of European domestic pigs from virulent African isolates of African swine fever virus by experimental immunisation [J]. *Vaccine*, 2011, 29 (28): 4593-4600.
- [28] CHAPMAN D A, TCHEREPANOV V, UPTON C, et al. Comparison of the genome sequences of non-pathogenic and pathogenic African swine fever virus isolates[J]. *J Gen Virol*, 2008, 89(Pt2): 397-408.
- [29] AFONSO C L, PICCONE M E, ZAFFUTO K M, et al. African swine fever virus multigene family 360 and 530 genes affect host interferon response[J]. *J Virol*, 2004, 78(4): 1858-1864.
- [30] BORCA M V, CARRILLO C, ZSAK L, et al. Deletion of a CD2-like gene, 8-DR, from African swine fever virus affects viral infection in domestic swine[J]. *J Virol*, 1998, 72(4): 2881-2889.
- [31] HURTADO C, BUSTOS M J, GRANJA A G, et al. The African swine fever virus lectin EP153R modulates the surface membrane expression of MHC class I antigens[J]. *Arch Virol*, 2011, 156(2): 219-234.
- [32] DE LEÓN P, BUSTOS M J, CARRASCOSA A L. Laboratory methods to study African swine fever virus[J]. *Virus Res*, 2012, 173(1): 168-179.
- [33] TULMAN E R, DELHON G A, KU B K, et al. African swine fever virus[J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2009, 328: 43-87.
- [34] LEWIS T, ZSAK L, BURRAGE T G, et al. An African swine fever virus *ERV1-ALR* homologue, *9GL*, affects virion maturation and viral growth in macrophages and viral virulence in swine[J]. *J Virol*, 2000, 74(3): 1275-1285.
- [35] ZSAK L, CALER E, LU Z, et al. A nonessential African swine fever virus gene UK is a significant virulence determinant in domestic swine [J]. *J Virol*, 1998, 72(2): 1028-1035.
- [36] ZSAK L, LU Z, KUTISH G F, et al. An African swine fever virus virulence-associated gene NL-S with similarity to the herpes simplex virus ICP34. 5 gene [J]. *J Virol*, 1996, 70(12): 8865-8871.
- [37] SALGUERO F J, GIL S, REVILLA Y, et al. Cytokine mRNA expression and pathological findings in pigs inoculated with African swine fever virus(E-70) deleted on A238L[J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2008, 124(1-2): 107-119.
- [38] NEILAN J G, BORCA M V, LU Z, et al. 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]. *J Gen Virol*, 1999, 80(Pt10): 2693-2697.
- [39] AFONSO C L, ALCARAZ C, BRUN A, et al. Characterization of p30, a highly antigenic membrane and secreted protein of African swine fever virus[J]. *Virology*, 1992, 189(1): 368-373.
- [40] ALCARAZ C, DE DIEGO M, PASTOR M J, et al. Comparison of a radioimmunoprecipitation assay to immunoblotting and ELISA for detection of antibody to African swine fever virus[J]. *J Vet Diagn Invest*, 1990, 2(3): 191-196.
- [41] ALCARAZ C, RODRIGUEZ F, OVIEDO J M, et al. Highly specific confirmatory western blot test for African swine fever virus antibody detection using the recombinant virus protein p54[J]. *J Virol Methods*, 1995, 52(1-2): 111-119.
- [42] GÓMEZ-PUERTAS P, RODRIGUEZ F, OVIEDO J M, et al. Neutralizing antibodies to different proteins of African swine fever virus inhibit both virus attachment and internalization [J]. *J Virol*, 1996, 70 (8): 5689-5694.
- [43] RODRIGUEZ F, ALCARAZ C, EIRAS A, et al. Characterization and molecular basis of heterogeneity of the African swine fever virus envelope protein p54 [J]. *J Virol*, 1994, 68(11): 7244-7252.
- [44] RODRIGUEZ F, LEY V, GÓMEZ-PUERTAS P, et

- al. The structural protein p54 is essential for African swine fever virus viability[J]. *Virus Res*, 1996, 40(2): 161-167.
- [45] GÓMEZ-PUERTAS P, RODRIGUEZ F, OVIEDO J M, et al. 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[J]. *Virology*, 1998, 243(2): 461-471.
- [46] BARDERAS M G, RODRÍGUEZ F, GÓMEZ-PUERTAS P, et al. Antigenic and immunogenic properties of a chimera of two immunodominant African swine fever virus proteins [J]. *Arch Virol*, 2001, 146(9): 1681-1691.
- [47] NEILAN J G, ZSAK L, LU Z, et al. Neutralizing antibodies to African swine fever virus proteins p30, p54, and p72 are not sufficient for antibody-mediated protection[J]. *Virology*, 2004, 319(2): 337-342.
- [48] RUÍZ-GONZALVO F, COLL J M. Characterization of a soluble hemagglutinin induced in African swine fever virus-infected cells[J]. *Virology*, 1993, 196(2): 769-777.
- [49] RUIZ-GONZALVO F, RODRÍGUEZ F, ESCRIBANO J M. Functional and immunological properties of the baculovirus-expressed hemagglutinin of African swine fever virus[J]. *Virology*, 1996, 218(1): 285-289.
- [50] IVANOV V, EFREMOV E E, NOVIKOV B V, et al. Vaccination with viral protein-mimicking peptides postpones mortality in domestic pigs infected by African swine fever virus[J]. *Mol Med Rep*, 2011, 4(3): 395-401.
- [51] VLASOVA N N, BALYSHEV V M, KAZAKOVA A S. Perspective of using the recombinant DNA-technology to control the spread of the African swine fever [J]. *Procedia Vaccinol*, 2011, 4: 92-99.
- [52] ANGULO A, VIÑUELA E, ALCAMÍ A. Inhibition of African swine fever virus binding and infectivity by purified recombinant virus attachment protein p12 [J]. *J Virol*, 1993, 67(9): 5463-5471.
- [53] ARGILAGUET J M, PÉREZ-MARTÍN E, GALLARDO C, et al. Enhancing DNA immunization by targeting ASFV antigens to SLA-II bearing cells[J]. *Vaccine*, 2011, 29(33): 5379-5385.
- [54] ARGILAGUET J M, PÉREZ-MARTÍN E, NOFRARÍAS M, et al. DNA vaccination partially protects against African swine fever virus lethal challenge in the absence of antibodies [J]. *PLoS One*, 2012, 7(9): e40942.
- [55] LACASTA A, BALLESTER M, MONTEAGUDO P L, et al. Expression library immunization can confer protection against lethal challenge with African swine fever virus[J]. *J Virol*, 2014, 88(22): 13322-13332.
- [56] RODRÍGUEZ F, ARGILAGUET J M, LACASTA A, et al. Vaccines against African swine fever: yes, we can! [J]. *Pig Prog*, 2013, 29: 8-10.
- [57] DIXON L K, RODRIGUEZ J M, SALAS M L. Vaccine against African swine fever virus, based on replication deficient recombinant viruses; WO2012107614 A1[P], 2012.

(编辑 白永平)