

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2020.06.12

非洲马瘟疫苗研究进展

印春生,李双星,刘业兵*

(中国兽医药品监察所,北京 10081)

[收稿日期] 2020-05-03 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2020) 06-0079-07 [中图分类号] S859.19

[摘要] 本文对非洲马瘟的病毒特性、临床症状和检测方法进行概述,重点对非洲马瘟的传统疫苗和新型疫苗的研究进展进行了详细综述,以期为非洲马瘟疫苗的相关研究提供参考。

[关键词] 非洲马瘟;疫苗;研究进展

Research Progress of African Horse Sickness Vaccines

YIN Chun-sheng, LI Shuang-xing, LIU Ye-bing*

(Institute of Veterinary Drug Control, Beijing, 100081)

Corresponding author: LIU Ye-bing, E-mail: zjsliuyebing@163.com

Abstract: In this paper, the virus characteristics, clinical symptoms and detection methods of African horse sickness were summarized at first, and then the research progress of traditional and novel vaccines of African horse sickness were reviewed in detail to provide reference for the relevant researchers.

Key words: African horse sickness; vaccine; research progress

非洲马瘟(African horse sickness)是由非洲马瘟病毒(African horse sickness virus, AHSV)引起的马属动物等单蹄动物的一种急性或亚急性非接触性虫媒传染病,呈地方性和季节性流行,主要以发热、皮下水肿及脏器出血为特征^[1]。该病主要流行于撒哈拉沙漠以南非洲、北非、中东及阿拉伯半岛的也门等地区,对马属动物危害较大,致死率高达95%以上,是世界动物卫生组织(OIE)规定的必须通报的疫病^[2-3]。

根据OIE网站相关信息,近几个月在泰国东北部的呵叻府暴发非洲马瘟疫情,以巴冲区域为疫情中

心。疫情时间起始于2020年2月24日,通报时已经至少影响到341匹易感马匹,其中62匹发病,42匹死亡。OIE接到报告后当即取消了泰国非洲马瘟的无疫区状态^[4]。2020年3月底以来,该国又报告多起非洲马瘟疫情,而且离我国边境直线距离不足800公里,疫情给我国的非洲马瘟防控带来极大风险。我国农业农村部于2020年4月22日发布《农业农村部办公厅关于做好非洲马瘟防范工作的通知》要求各相关单位加强非洲马瘟的疫情监测、疫苗制造和质量控制等相关技术储备^[5]。为此,本文综述了非洲马瘟疫苗的研究进展,以期为相关研究提供参考。

作者简介:印春生,研究员,从事兽用生物制品检验及检测技术研究工作。

通讯作者:刘业兵。E-mail: zjsliuyebing@163.com

1 非洲马瘟病毒

非洲马瘟病毒属于呼肠孤病毒科 (Reoviridae) 环状病毒属 (Orbivirus) 成员,与蓝舌病病毒 (Blue tongue virus, BTV) 和马器质性脑炎病毒 (Equine encephalosis virus, EEV) 等其他环状病毒形态结构相似^[1]。AHSV 的基因组由 10 个双链 RAN 片段组成,编码 7 种结构蛋白 (VP1 ~ VP7) 和 4 种非结构蛋白 (NS1、NS2、NS3 和 NS3a)。病毒的基因组包裹在由 VP3 和 VP7 两个主要蛋白与 VP1、VP4 和 VP6 三个体积较小蛋白组成的核心颗粒内,120 个 VP3 蛋白组成的“子核”及病毒的 VP1、VP4 和 VP6 蛋白共同构成病毒的核心。病毒外部是由 780 个 VP7 蛋白构成,其功能是维持子核层结构的稳定性,子核和 VP7 蛋白共同形成病毒的内衣壳,其中 VP3、VP7 蛋白被认为是形成内衣壳的主要蛋白。病毒的外衣壳是由 VP2 和 VP5 蛋白的三聚体组成,VP2 是主要的变异性抗原蛋白,与病毒核心共同构成完整的病毒粒子^[6]。外衣壳蛋白是病毒的首要分型抗原,决定病毒中和抗体特异性,VP2 被认为是最主要的 AHSV 血清型特异性抗原,但在缺乏 VP2 蛋白时 VP5 蛋白也可以产生一定程度的中和抗体^[7]。非洲马瘟病毒共有 9 个血清型^[8,9],感染后痊愈的马属动物会对相应的血清型产生很好的免疫力,对其他血清型也可产生部分免疫保护效果,但保护效果一般较差。

2 症状及诊断

非洲马瘟为高度传染性疾病,但非接触性传染病,该病毒不能在马匹中直接传播,必须经过中间媒介库蠓等昆虫叮咬进行传播,但在某些蜱类体内也可分离到病原^[10]。AHSV 在不同宿主内所引起的病毒血症持续时间不同,一般持续 4 ~ 8 日。犬可以通过食用污染病毒的马类制品而发生 AHS,但犬在 AHSV 传播和储存过程中发挥较少作用^[11]。非洲马瘟的临床表现根据发病程度和严重性可分为心型、心肺型、肺型和发热型(马瘟型)四个类型,主要表现为发热、呼吸困难等,致死率可达 90% 以上^[12]。

非洲马瘟的诊断没有统一国际标准。当发生疫病时,可先用 ELISA 或 PCR 等进行快速鉴定,然

后在实验室分离病毒。疫情暴发时,应尽早通过病毒中和试验,或采用 RT-PCR 并结合测序方法,以确定血清型。

2.1 病原学诊断 对疑似患病动物进行临床诊断需要结合临床症状、病理变化以及流行病学信息综合分析和诊断,但由于大部分临床症状和病变并不是 AHSV 所特有的,所以要确诊还需要对病毒进行分离鉴定。通常在动物发热期间采集抗凝血样品或在动物刚死亡时采集脾、肺、淋巴结、唾液腺等样品进行病毒分离。AHSV 首选分离方法是在 2 ~ 4 日龄乳鼠脑内接种病毒^[13]。AHSV 也可以在昆虫细胞,如蚊子细胞、库蠓细胞中繁殖,但他们不会在这些细胞上引起细胞病变(CPE),这些细胞系通常仅用于病毒的扩增,为病毒在哺乳动物细胞分离进行预培养。常见的哺乳动物细胞系如仓鼠肾细胞(BHK)、非洲绿猴细胞(Vero)等都可以用来分离 AHSV,一般可在 7 日内产生细胞病变^[14]。

病原学确诊最佳方法为反转录聚合酶链式反应(RT-PCR),可以利用分子探针或者以 AHSV 的 VP3 和 VP7 蛋白基因序列为模板设计引物进行 RT-PCR,对组织中含有的病毒进行鉴定,RT-PCR 方法可以在几个小时内对 AHSV 含量很低的无活病毒样品进行分型。间接夹心 ELISA 也可以快速诊断急性感染死亡动物体内固体组织中 AHSV 抗原。另外,群特异性试验补体结合试验、直接和间接免疫荧光实验也可以鉴定分离病毒。

2.2 血清学诊断 血清学诊断主要针对能够产生群特异性抗体的病毒 VP7 蛋白,目前已成功研制多种血清学检测方法,如补体结合试验、琼脂免疫扩散实验、免疫荧光实验和 ELISA 试验等^[15,16]。另外,有报道已经建立了针对 4 型 AHSV-NS3 蛋白的间接 ELISA 方法^[17],该方法可以将自然感染的动物和接种灭活疫苗的动物相区分。血清中和试验(SNT)可以鉴别血清型特异性抗体,由于感染初期抗体水平较低,SNT 在初期诊断中不是很常用,但在 AHSV 的血清学监测中还是重要的检测方法之一。在 AHS 流行的地区,可能存在多种血清型混合感染的情况存在,所以需要采集样品多次,每次样品采集时间至少需要间隔 2 周以上才能进行

确诊。

3 疫苗研究进展

目前,在疫情流行的地区,对于 AHS 的防控主要以疫苗免疫预防和对症辅助性控制为主,主要使用弱毒苗对马匹进行免疫接种,其中多价弱毒苗的应用使 AHS 的暴发频率和程度大大降低。灭活疫苗曾经使用过几年,但是由于一些固有缺陷现已停用。近十几年以来,随着生物学的发展和生物技术的不断进步,AHS 核酸疫苗、亚单位疫苗、活载体疫苗等一系列新型疫苗的研发取得了较大进步,并均取得了良好的免疫效果。

3.1 弱毒活疫苗 最早在 20 世纪 30 年代,Alexander 就证明 AHSV 的小鼠适应株可在鸡胚中繁殖,并在不丧失免疫原性的情况下能够在鸡胚中连续传代,使得病毒的毒力逐渐减弱,该研究同时证明 AHSV 存在多种毒株,并且不同毒株对免疫马的保护效果差异较大,保护率在 26% ~ 81% 之间^[18]。60 年代,Erasmus 等利用哺乳动物细胞培养的方法成功繁殖 AHSV,并发现病毒引起细胞的蚀斑大小可区分 AHSV 的不同毒株,该发现进一步促进了弱毒活疫苗的研制^[19]。在过去的几十年里,人们成功研制出多种不同血清学的多价弱毒疫苗,并均应用于马匹的接种。现有的多价活疫苗应用效果研究认为,血清 1 型和 2 型、3 型和 7 型、5 型和 8 型以及 6 型和 9 型之间均存在交叉保护,但是血清 4 型和其他血清型之间均没有交叉保护。但 2006 年在南非的西开普省暴发了 9 起 5 型 AHSV 引起的疫情,这使得人们开始质疑多价活疫苗的免疫能否产生对血清 5 型的 AHSV 足够保护。目前,常见的多价弱毒活疫苗主要为两种,分别为三价苗(血清型 1、3 和 4)和四价苗(血清型 2、6、7 和 8)^[20]。

虽然弱毒活疫苗是目前预防 AHS 的最佳选择,但它的使用也引起了人们对其他一些问题的关注。如马匹群内以及不同血清型之间的血清型特异性免疫应答的差异很大,动物可能需要多次免疫接种才能完全获得所有 9 种 AHS 血清型保护。此外,流行毒株与疫苗毒株之间的基因重组可能导致新的遗传变异或使弱毒疫苗株的毒力返强。2004 ~ 2014 年,在西开普地区流行的毒株、弱毒活

疫苗毒株同 AHSV 参考毒株的全基因组序列比对研究结果表明,活疫苗毒株的内部基因发生了重组,并恢复了强毒的毒力^[21]。弱毒株病毒的另一个缺点是不能从血清学上鉴别是疫苗接种诱导的免疫还是自然感染诱导产生的免疫,易引起对动物的不必要扑杀。

3.2 灭活疫苗 非洲马瘟灭活疫苗具有良好的免疫效果,尤其防控 4 型的 AHS,通常采用灭活疫苗进行免疫。AHS 灭活疫苗的生产中常使用的灭活剂为甲醛、 β -丙内酯或溴甲基亚胺等^[22-23],后两种灭活剂主要作用于核酸而非蛋白,以确保疫苗的免疫原性不受损害。常用的灭活疫苗有组织毒灭活疫苗和细胞毒灭活疫苗。组织毒灭活疫苗是制造方法比较原始的一种疫苗,即取濒死期典型病马的脾脏,研磨成乳剂,加入灭活剂灭活后,当地直接用作预防接种。这种疫苗目前只在个别地区用作紧急预防注射。细胞毒灭活疫苗是将 AHSV 细胞适应株接种哺乳动物细胞系上大量增殖,随后在病毒培养液内加入灭活剂灭活处理后,再加入氢氧化铝佐剂,制成单价或多价疫苗。研究报道,AHS 9 型灭活疫苗免疫接种豚鼠和马都产生了中和抗体反应,证实了豚鼠可作为疫苗有效性评价的替代动物,攻毒试验结果表明,免疫马能够抵抗强毒的攻击^[24]。灭活疫苗的主要缺点是生产成本高,大规模分离纯化病毒,需要严格控制生物安全风险;需要多次反复接种才能够保持较好的免疫性能;在血清学上无法区分动物是接种疫苗还是受到感染。商品化的 AHS 灭活疫苗曾经在 1987 ~ 1991 年期间用于西班牙、葡萄牙和摩洛哥的 AHS 疫情的防控,但目前已不再生产这种疫苗^[1]。

3.3 核酸疫苗 核酸疫苗也称 DNA(或 RNA)疫苗,是指将含有编码目的蛋白基因序列的质粒载体,经肌肉注射等方法接种宿主体内,通过宿主细胞表达抗原蛋白,诱导宿主细胞产生对该抗原蛋白的免疫应答,以达到预防和治疗疾病的目的。有关 AHS 的核酸疫苗研究报道较少,仅有 Romito 等报道 AHSV-VP2 的 DNA 作为核酸疫苗的研究,该核酸疫苗在接种马匹后仅观察到一匹马产生了 VP2 蛋白特异性的体液和细胞免疫反应,并且这四

马在随后爆发的 AHS 疫情中存活下来,但是报道的中和抗体滴度较低,也没有进行强毒攻毒试验研究。此外,用克隆的 AHS VP2 cDNA 免疫母鸡,可刺激卵黄 IgY 抗体的产生,其血清中和效价比用纯化的 AHS 疫苗接种后低 80 倍。因此,实际生产中很难生产出适用的 AHS 核酸疫苗^[25]。

3.4 亚单位疫苗 亚单位疫苗,即通过化学分解、有控制性的蛋白水解、生物合成或基因重组亚单位蛋白制备的疫苗。AHS 的亚单位疫苗研究目前主要通过基因重组主要结构蛋白的方法制备。有研究报道,通过杆状病毒表达系统产生的重组 AHSV VP2 已单独或联合 VP5 或 VP7 作为亚单位疫苗使用,并被证明可诱导产生保护性免疫。但是重组获得的可溶性抗原的免疫原性一般较差,从昆虫细胞裂解物中纯化的杆状病毒所表达 VP2 的聚集性,再加上重复免疫接种的要求,以及使用强效佐剂增强免疫原性,一定程度上限制了这类亚单位疫苗的应用^[26-28]。但是,亚单位疫苗具有自身优势,它们可以区分动物是被流行毒株感染,还是接种疫苗。

3.5 痘病毒载体疫苗 Guthrie 等用同时表达 AHSV 4 VP2 和 VP5 蛋白的金丝雀痘病毒疫苗接种马,可诱导产生针对该血清型病毒的特异性中和抗体。攻毒实验表明,高剂量疫苗免疫的马抵抗了产 AHSV 4 的攻击,血清中和抗体效价范围从 1:10 到 1:80^[29]。但是,免疫马产生的中和性抗体效价与攻毒保护试验结果之间的关系没有的明确相关性,血清抗体阴性的马在攻毒后也可能存活。此外,在疫苗的后续研究中还发现 VP2 和 VP5 蛋白免疫后均检测到 γ 干扰素的产生,这表明细胞介导的免疫反应很可能也在攻毒保护中起到重要作用。过去十多年来,已有多篇基于改良的安卡拉牛痘病毒 (Modified Vaccinia Virus Ankara, MVA) 重组 AHSV 蛋白疫苗的研究报道^[30-33]。MVA 毒株最初是在鸡胚成纤维细胞 (CEF) 中连续传代的牛痘病毒,连续传代引起 12% 的病毒基因组丢失,包括干扰宿主免疫反应的基因,并导致在大多数哺乳动物细胞中无法复制。重组 MVA 疫苗是非复制的活病毒载体,既可诱导体液免疫又可产生细胞免疫,通过细胞表面的 MHC 分子促进抗原在细胞内的表达。已

有研究表明 MVA 疫苗是最有效的疫苗研究策略,在启动疫苗接种后作为异种抗原刺激,促进已有的 T 细胞对重组抗原免疫反应,减少对病毒载体本身抗原的应答,从而避免了对病毒载体已有免疫的问题。用表达 AHSV VP2 (MVA - VP2) 的 MVA 进行同源引物增强免疫也可以诱导中和性抗体,从而对免疫小鼠或马都产生攻毒保护作用。研究结果表明,仅表达外衣壳蛋白 VP2 的 MVA 疫苗接种试验动物也可产生免疫保护,说明 VP5 不是这类疫苗的必要成分,但可提高疫苗的效果。将接种 MVA - VP2 小鼠的脾细胞移植到未接种的对照小鼠,并未导致显著的病毒血症的统计学差异,而且对小鼠注射阳性血清产生的被动免疫也能够使小鼠获得免疫攻毒保护,因此体液免疫可能发挥更为重要的作用。但是使用 MVA - VP2 或 MVA - NS1 免疫的小鼠在受到多肽序列刺激时,能够产生干扰素的细胞上调现象^[34],说明细胞免疫可能在一定程度上起到辅助保护作用。

多价 AHSV 疫苗研究结果表明,马在 4 周后分别接种 4 型 MVA - VP2 (4) 或 9 型 MVA - VP2 (9) 或两者同时接种或连续接种,产生了针对 AHSV 4 和 AHSV 9 的中和抗体。接种 4 个月后,当中和抗体滴度急剧下降时,再接种 5 型 AHSV 的 MVA - VP2 (5) 疫苗不仅能诱导产生 AHSV 5 的中和抗体,而且还能诱导产生 AHSV 4、6 和 9 非特异性抗体。这些结果表明,MVA - VP2 可作为一种多价疫苗,用于对一种以上的 AHSV 血清型的防控。试验结果还表明,在 AHSV 血清型 5、6、8 和 9 之间可能存在其他交叉反应的抗原表位。研究进一步证实,病毒载体的免疫不会对 MVA - VP2 疫苗的效果产生影响^[32]。Calvo 等^[33]用活疫苗 MVA - VP2,热灭活 MVA - VP2,紫外灭活 MVA - VP2 和蔗糖梯度纯化 MVA - VP2 等四种不同的 4 型 AHSV 的 MVA - VP2 疫苗诱导免疫应答,结果证实 MVA 疫苗中表达的 VP2 蛋白和接种后宿主细胞中瞬时表达的 VP2 蛋白都能够诱导保护性免疫应答。

3.6 反向遗传学疫苗 在过去的十多年中,反向遗传操作系统已用于构建基于活病毒的 AHSV 新型疫苗。这些活疫苗毒株通过构建病毒复制复合

体编码五个病毒蛋白 VP1, VP3, VP4, VP6 和 NS2 的 cDNA 质粒, 先转染入哺乳动物细胞系中, 第二次再转染十个具有完全复制能力的病毒 RNA 转录本, 然后激发宿主细胞启动病毒完全复制进行病毒拯救。

不同的 AHSV 病毒血清型可以通过使用相同的初级转录复合物进行拯救, 然后交换 T7 RNA 转录的一种或多种衣壳蛋白, 可将编码这些蛋白质的基因整合到一个常见的经过精确设计病毒基因组中, 病毒基因组中可以包含一个或多个缺失基因, 目前已经研制成功两种生产缺陷病毒株的主要疫苗技术平台。由于可入侵细胞而无复制能力 (ECRA) 的疫苗毒株 (以前也称为作为无传染性的一次性复制毒株, DISC) 缺少功能性的 VP6 基因, 因此即使在受感染的细胞中也无法完成一个完整的复制周期。基因缺失疫苗毒株能够在表达 VP6 基因的细胞系中拯救成功, 并不断增殖, 但是拯救的病毒并无感染活性。相比之下, 无传染性的一次性复制 (DISA) 疫苗株缺乏非必需基因和非结构蛋白 NS3 / NS3a 基因的共表达^[35-37]。没有这些蛋白质的表达, 可防止病毒的释放, 从而抑制产生病毒血症, 在没有蚊虫叮咬传播的情况下, 仅在受感染动物体内局部复制。这些反向遗传构建的疫苗均符合区分自然感染和疫苗免疫 (DIVA) 疫苗的标准。

AHSV 新型反向遗传学疫苗研发的主要目标是针对 9 种血清型病毒提供保护。研究人员尝试研制一系列基因缺失毒株, 每个毒株均包含不同血清型的 VP2 特异性衣壳蛋白。但是, 仅替换一种蛋白基因会导致获得的重组病毒与亲本毒株相比病毒滴度显著下降。想要获得具有适当复制缺陷的各血清型疫苗株, 就需要在病毒基因组替换 VP2 和 VP5 两个基因或 VP2、VP3、VP5、VP7 和 NS3 的五个基因, 具体替换数量根据拟构建的病毒血清型。已经用马驹对 4 型 AHSV 单价疫苗或 1-4-6-8 型的四价 AHSV 疫苗的安全性和免疫原性进行了科学评价^[36]。攻毒实验中, 免疫马均获得了较好的保护。虽然反向遗传学疫苗看起来很有希望, 但是还需要进一步研究免疫剂量和免疫持续期, 相关的疫

苗成本和其他要求可能限制其进一步商业化生产^[38]。

3.7 病毒样颗粒疫苗 病毒样颗粒 (VLP) 是一类安全、无自主复制能力蛋白复合物, 它们本身具有佐剂性能, 与亚单位疫苗相比具有更高免疫原性, 因为抗原表位以有序重复阵列显示在完整的病毒粒子表面, 具有巨大的天然抗原优势。VLP 与宿主免疫细胞的相互作用可诱导先天性以及获得性的体液和细胞免疫反应, 同时又不存在毒力返强或活毒感染的风险, 使其成为极具吸引力的新型疫苗。某些病毒成分的缺失可以用分子诊断技术区分接种疫苗的动物和感染的动物, 符合 DIVA 疫苗的标准。AHSV 的 VP2, VP3, VP5 和 VP7 蛋白质通过疏水, 静电和共价相互作用导致 VLP 的自发自组装。大多数重组蛋白可以在昆虫细胞系、微生物发酵系统、哺乳动物细胞培养物中、转基因动物以及植物表达系统构建 VLP。

通过与昆虫细胞共同感染产生的 AHSV CLP (核心样颗粒) 还在初步研究, 表达 AHSV VP3 或 VP7 的重组杆状病毒未构建成功。CLP 代表病毒的内部和中间蛋白质层, 而缺少由完整 VLP 形成所需的蛋白 VP5 和 VP2。在后续的研究中, 共表达 AHSV 蛋白的感染以及 AHSV CLP 和 VLP 的组装均通过与杆状病毒重组体同时表达两种 AHSV 衣壳蛋白, 即 VP2 和 VP3 或 VP5 和 VP7, 但是, 整体 VLP 产量非常低, 无法进行量化生产^[39]。

Dennis 等^[40-41]已开发一种植物生产的 AHSV VLP 疫苗, 将常见的两种不同血清型的 AHSV 四种衣壳蛋白在普通的烟草中进行瞬时共表达, AHSV VLP 能够有效地自我组装, 形成良好的空间结构, 免疫接种马具有良好的安全性并产生良好的免疫反应。这类新型的 VLP 疫苗是一种完全由蛋白质组成的, 无传染性的疫苗, 应用植物表达系统生产能够显著降低生产成本。此外, 该类疫苗技术平台模拟 AHSV 天然野毒株的免疫原性, 对免疫的动物都不会产生任何副作用, 并且不存在毒力返强风险。以 5 型 AHSV 的 VLP 免疫马匹的血清还能够产生针对 8 型 AHSV 交叉免疫反应, 结果进一步证实了这两种血清型之间具有交叉保护作用。

4 小 结

非洲马瘟对马来说是一种致死性疾病。目前对于患病马匹除了良好的饲养管理外,还没有特异性的治疗方法,可以采取各种干预支持措施,如使用非甾体抗炎药来缓解疼痛、发热,抗生素来防止继发细菌感染,或糖皮质激素来帮助稳定细胞膜和保持血管膜完整性,但这些措施都是辅助性治疗。我国目前尚未发现此病,为防止从国外传入,禁止从发病国家和地区输入易感动物或相关制品。发生可疑病例时,按《中华人民共和国动物防疫法》规定,采取紧急、强制性的控制和扑灭措施,同时相关部门应及时采样进行病毒鉴定,确诊病原及血清型,扑杀病马及同群马,尸体进行深埋或焚烧销毁处理。我国相关科研单位必须在经过主管部门审批同意后开展相关科研工作,尤其对疑似病料等生物性材料必须在有资质的高等级生物安全实验室操作,严格防止病毒扩散或泄露。

参考文献:

- [1] Mellor P S, Hamblin C. African horse sickness. *Veterinary Research*[J]. 2004, 35:445 - 466.
- [2] 扈荣良. 现代动物病毒学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2014:936.
Hu R L. *Modern animal virology* [M]. Beijing, China Agricultural Press 2014:936.
- [3] 郑世军,宋清明. 现代动物传染病学[M]. 北京: 中国农业出版社,2013. 616.
Zheng S J, Song Q M. *Modern zoonotic diseases* [M]. Beijing, China Agricultural Press,2013:616.
- [4] <https://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/official-disease-status/african-horse-sickness/suspension-reinstatement-of-status/>[Z]
- [5] 农业农村部办公厅关于做好非洲马瘟防范[EB/OL]. [2020-04-24]. http://www.ivdc.org.cn/tzgg01/tz/202004/t20200424_51711.htm.
Notification on the prevention of African horse sickness by the general office of the ministry of agriculture and rural affairs [EB/OL]. [2020-04-24]. http://www.ivdc.org.cn/tzgg01/tz/202004/t20200424_51711.htm.
- [6] 潘佳亮. 非洲马瘟病毒 VP7 蛋白的原核表达及其间接 ELISA 方法的建立[D]. 东北农业大学,2013.
Pan J L. *Development the Indirect ELISA Based on the Prokaryotic Expression of VP7 Gene of African Horse Sickness Virus* [D]. Northeast Agricultural University, 2013.
- [7] Martinez J L, Langeveld J P, Venter A, *et al.* Antigenic profile of African horse sickness virus serotype 4 VP5 and identification of a neutralizing epitope shared with bluetongue virus and epizootic hemorrhagic disease virus[J]. *Virology*,1999,257(2):449 - 459.
- [8] Howell P. The isolation and identification of further antigenic types of African horse sickness virus[J]. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*,1962,29, 139 - 149.
- [9] McIntosh B M. Immunological types of horse sickness virus and their significance in immunization [J]. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*,1958,27:465 - 536.
- [10] Venter G J, Meiswinkel R. The virtual absence of *CuLicoidesimicoLa* (Diptera, Ceratopogonidae) in a light-trap survey of the colder, high-lying area of the eastern orange free state, South Africa, and implications for the transmission of arboviruses [J]. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 1994, 61(4):327 - 340.
- [11] Van R I, DE Clerk J, Groenewald, *et al.* An outbreak of African horse sickness in dogs[J]. *Journal of the South African Veterinary Association*,1981,52(4):323 - 325.
- [12] Mellor P. Epizootiology and vectors of African horse sickness virus [J]. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 1994, 17(3):287 - 296.
- [13] Martin L A, MEYER A, Arar O, *et al.* Phylogenetic analysis of African horse sickness virus segment 10: sequence variation, virulence characteristics and cell exit [M]. *African Horse Sickness*, Springer, 1998:281 - 293.
- [14] Erasmus B. Some observations on the propagation of horse sickness virus in tissue culture [J]. *Bull Off Int Epizoot*, 1964,62:923 - 928.
- [15] Hamblin C, Mellor P, Graham S, *et al.* Antibodies in horses, mules and donkeys following monovalent vaccination against African horse sickness [J]. *J. Epidemiol Infect*, 1991, 104: 365 - 371.
- [16] Laviada M D, Roy P, Sanchez - Vizcaino J M. Adaptation and evaluation of an indirect ELISA and immunoblotting test for African horse sickness antibody detection [M]. 1992.
- [17] Laviada M D, Roy P, Sanchez - Vizcaino J M, *et al.* The use of African horse sickness virus NS3 protein, expressed in bacteria, as a marker to differentiate infected from vaccinated horses [J]. *Virus Research*, 1995, 38(2):205 - 218.
- [18] Alexander, R A. The immunization of horses and mules against Horse Sickness by means of the neurotropic virus of mice and guinea-pigs [J]. *Onderstepoort J. Vet. Sci Anim Ind* 1934, 2,

- 375 – 391.
- [19] Erasmus, B J. Cultivation of horsesickness virus in tissue culture [J]. *Nature*, 1963, 200:716.
- [20] Von Teichman, B F, Smit, T K Evaluation of the pathogenicity of African Horsesickness (AHS) isolates in vaccinated animals [J]. *Vaccine*, 2008, 26:5014 – 5021.
- [21] Weyer, C T, Grewar, J D, Burger P, *et al.* African Horse Sickness Caused by Genome Reassortment and Reversion to Virulence of Live, Attenuated Vaccine Viruses, South Africa, 2004 – 2014 [J]. *Emerg. Infect. Dis*, 2016, 22:2087 – 2096.
- [22] Mirchamsy H, Taslimi H. Inactivated African horse sickness virus cell culture vaccine [J]. *Immunology* 1968, 14(1):81 – 88.
- [23] Weyer C T, Quan M, Joone C, *et al.* African horse sickness in naturally infected, immunised horses [J]. *Equine Vet. J*, 2013, 45: 117 – 119.
- [24] Lelli R, Molini U, Ronchi G F, *et al.* Inactivated and adjuvanted vaccine for the control of the African horse sickness virus serotype 9 infection; Evaluation of efficacy in horses and guinea – pig model [J]. *Vet. Ital*, 2013, 49:89 – 98.
- [25] Romito M, Du Plessis, Viljoen G J. Immune responses in a horse inoculated with the VP2 gene of African horsesickness virus [J]. *Onderstepoort J. Vet. Res*, 1999, 66:139 – 144.
- [26] Roy P, Bishop D H, Howard S, *et al.* Recombinant baculovirus – synthesized African horsesickness virus (AHSV) outer – capsid protein VP2 provides protection against virulent AHSV challenge [J]. *J. Gen. Virol.* 1996, 77, 2053 – 2057.
- [27] Martinez J L, Diaz M, Roy P, *et al.* Full protection against African horsesickness (AHS) in horses induced by baculovirus – derived AHS virus serotype 4 VP2, VP5 and VP7 [J]. *J. Gen. Virol.* 1996, 77:1211 – 1221.
- [28] Kanai Y, Van Rijn P A, Maris – Veldhuis M, *et al.* Immunogenicity of recombinant VP2 proteins of all nine serotypes of African horse sickness virus [J]. *Vaccine*, 2014, 32:4932 – 4937.
- [29] Guthrie A J, Quan M, Lourens C W, *et al.* Protective immunization of horses with a recombinant canarypox virus vectored vaccine expressing genes encoding the outer capsid proteins of African horse sickness virus [J]. *Vaccine*, 2009, 27:4434 – 4438.
- [30] Calvo P E, Casanova I, Bachanek B K, *et al.* A modified vaccinia Ankara virus (MVA) vaccine expressing African horse sickness virus (AHSV) VP2 protects against AHSV challenge in an IFNAR – / – mouse model [J]. *PLoS ONE*, 2011, 6:e16503 – 6511.
- [31] Alberca B; Bachanek B K, Cabana M, *et al.* Vaccination of horses with a recombinant modified vaccinia Ankara virus (MVA) expressing African horse sickness (AHS) virus major capsid protein VP2 provides complete clinical protection against challenge [J]. *Vaccine*, 2014, 32:3670 – 3674.
- [32] Manning N M, Bachanek K, Mertens P P C, *et al.* Vaccination with recombinant Modified Vaccinia Ankara (MVA) viruses expressing single African horse sickness virus VP2 antigens induced cross – reactive virus neutralising antibodies (VNAb) in horses when administered in combination [J]. *Vaccine*, 2017, 35:6024 – 6029.
- [33] Calvo P E, Gubbins S, Mertens P, *et al.* The immunogenicity of recombinant vaccines based on modified Vaccinia Ankara (MVA) viruses expressing African horse sickness virus VP2 antigens depends on the levels of expressed VP2 protein delivered to the host [J]. *Antivir. Res*, 2018; 154, 132 – 139.
- [34] De la P F; Marin L A, Castillo O J, *et al.* Identification of CD8 T cell epitopes in VP2 and NS1 proteins of African horse sickness virus in IFNAR (– / –) mice [J]. *Virus Res*, 2015, 210: 149 – 153.
- [35] Van de water S G, Van gennip R G, Potgieter C A, *et al.* VP2 Exchange and NS3/NS3a Deletion in African Horse Sickness Virus (AHSV) in Development of Disabled Infectious Single Animal Vaccine Candidates for AHSV [J]. *J. Virol*, 2015, 89: 8764 – 8772.
- [36] Lulla V, Losada A, Lecollinet S, *et al.* Protective efficacy of multivalent replication – abortive vaccine strains in horses against African horse sickness virus challenge [J]. *Vaccine*, 2017, 35:4262 – 4269.
- [37] Van Rijn P A, Maris M A, Potgieter C A, *et al.* African horse sickness virus (AHSV) with a deletion of 77 amino acids in NS3/NS3a protein is not virulent and a safe promising AHS Disabled Infectious Single Animal (DISA) vaccine platform [J]. *Vaccine*, 2018, 36:1925 – 1933.
- [38] Weyer C T, Grewar J D, Burger P, *et al.* Dynamics of African horse sickness virus nucleic acid and antibody in horses following immunization with a commercial polyvalent live attenuated vaccine [J]. *Vaccine*, 2017, 35:2504 – 2510.
- [39] Maree S, Maree F F, Putterill J F, *et al.* Synthesis of empty African horsesickness virus particles [J]. *Virus Res*, 2016, 213: 184 – 194.
- [40] Dennis S J, Meyers A E, Guthrie A J, *et al.* Immunogenicity of plant – produced African horse sickness virus – like particles: Implications for a novel vaccine [J]. *Plant Biotechnol. J.*, 2018, 16:442 – 450.
- [41] Dennis S J, O’Kennedy M M, Rutkowska D, *et al.* Safety and immunogenicity of plant – produced African horse sickness virus – like particles in horses [J]. *Veterinary Research*, 2018, 49:105 – 110.