

## ИЗУЧЕНИЕ АНТИГЕННОСТИ, ИММУНОГЕННОСТИ И ПРОТЕКТИВНОСТИ ДНК-КОНСТРУКЦИЙ, СОДЕРЖАЩИХ ФРАГМЕНТЫ ГЕНОВ CP204L, E183L И EP402R ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ\*

А.Р. ИМАТДИНОВ, О.А. ДУБРОВСКАЯ, Д.Ю. МОРОЗОВА, В.М. ЛЫСКА,  
А.Д. СЕРЕДА

Африканская чума свиней (АЧС, ASF) — вирусная контагиозная септическая болезнь, поражающая диких и домашних свиней всех пород и возрастов. У домашних свиней и диких европейских кабанов отмечают сверхострое или острое течение заболевания с лихорадкой, признаками токсикоза, геморрагическим диатезом и смертностью до 100 %. В эндемичных регионах (некоторые страны Восточной Африки) описана подострая форма болезни со смертностью от 30 до 70 %, а также хроническая — с очень низкой смертностью (S. Blome с соавт., 2013; С. Gabriel с соавт., 2011; J.M. Sánchez-Vizcaino с соавт., 2015). Против АЧС вакцин нет. Исследования по разработке живых, инактивированных, субъединичных вакцин пока не принесли желаемых результатов (P.J. Sánchez-Cordun с соавт., 2017; V. O'Donnell с соавт., 2016; S. Blome с соавт., 2014). В ряде лабораторий мира в качестве перспективы рассматривается возможность получения ДНК-вакцины на основе генов потенциально протективных белков вируса АЧС (ASFV) — p30, p54 и CD2v. Белки p30 и p54 функционально важны в прикреплении ASFV к клетке-мишени. Антитела к p54 блокируют связывание вириона с макрофагом, тогда как антитела к p30 ингибируют проникновение вириона в клетку. CD2v обуславливает гемадсорбирующие свойства вируса (S.D. Kolnberger с соавт., 2002; M.G. Barderas с соавт., 2001; J.G. Neilan с соавт., 2004). В своем исследовании мы оценили антигенные, иммуногенные и протективные свойства продуктов трансляции рекомбинантных плазмид pCI-neo/ASFV/p30, pCI-neo/ASFV/p54 и pCI-neo/ASFV/CD2v при индукции в адгезивных клетках (А-клетках) аутологичных первичных культур лейкоцитов крови свиней (ЛС). Антигенную активность рекомбинантных белков, продуцируемых используемыми ДНК-конструкциями, определяли методом прямой иммунофлуоресценции в культурах клеток HEK-293T и ЛС. Максимум экспрессии антигенно активных продуктов трансляции в клетках HEK-293T и ЛС, трансфицированных pCI-neo/ASFV/p30, pCI-neo/ASFV/p54, pCI-neo/ASFV/CD2v, наблюдали на 2-3-и сут. Особенность схемы иммунизации состояла в том, что свиней трижды (с интервалом 14 сут) иммунизировали А-клетками аутологичной культуры ЛС, трансфицированными *in vitro* рекомбинантными плазмидными ДНК-конструкциями. Для этого от свиной №№ 1-4 получали по 90 см<sup>3</sup> культуры клеток ЛС. На 2-е сут культивирования в них вносили по 90 мкг pCI-neo/ASFV/p30 (№ 1), pCI-neo/ASFV/p54 (№ 2) или pCI-neo/ASFV/CD2v (№ 3). От свиной № 4 90 см<sup>3</sup> культуры ЛС делили на три части по 30 см<sup>3</sup> и трансфицировали каждую одной из трех конструкций (pCI-neo/ASFV/p30, pCI-neo/ASFV/p54 или pCI-neo/ASFV/CD2v), внося по 30 мкг плазмидной ДНК. Через 2 сут свиным №№ 1-4 вводили в центральную ушную вену около 10<sup>7</sup> аутологичных трансфицированных А-клеток культур ЛС. Методами непрямого твердофазного иммуноферментного анализа и иммуноблоттинга мы не обнаружили антител к белкам ASFV в крови иммунизированных животных на 14-е, 28-е и 42-е сут. На 42-е сут после заражения свиней ASFV штамма Мозамбик 78 в область шеи в дозе 10<sup>2</sup> ГАЕ<sub>50</sub> четыре иммунизированные свиньи (№№ 1-4) пали на 6-8-е сут, а контрольная (№ 5, не иммунизирована) — на 13-е сут. Таким образом, иммунизация аутологичными антигенно активными А-клетками ЛС, трансфицированными рекомбинантными плазмидами pCI-neo/ASFV/p30, pCI-neo/ASFV/p54, pCI-neo/ASFV/CD2v, не индуцировала выработку вирусоспецифических антител и защиту от контрольного заражения.

**Ключевые слова:** африканская чума свиней, ASFV, рекомбинантные плазмиды, белки ASFV p30, p54 и CD2v, антигенность, иммуногенность.

Африканская чума свиней (АЧС, ASF) — вирусная контагиозная септическая болезнь, поражающая диких и домашних свиней всех пород и возрастов. У домашних свиней и диких европейских кабанов отмечают сверхострое или острое течение заболевания с лихорадкой, признаками токсикоза, геморрагическим диатезом и смертностью до 100 %. В эндемичных регионах (некоторые страны Восточной Африки) отмечают подострую форму со смертностью от 30 до 70 %, а также хроническую — с очень низкой

\* Работа выполнена в рамках проекта РФФ «Создание кандидатной вакцины против африканской чумы свиней на основе химерных вирусов» (проект № 16-16-00090).

смертностью (1-3). Исследования по разработке живых, инактивированных, субъединичных вакцин пока не принесли желаемых результатов (4-6). Определенные надежды возлагаются на конструирование рекомбинантных ДНК-вакцин (7, 8).

Вероятно, формирование специфической защиты при АЧС обеспечивается набором белков, которые индуцируют иммунологическую защиту, которую обеспечивают как цитотоксические Т-лимфоциты, так и антителозависимая клеточная цитотоксичность (9-11). На основании данных о локализации, структуре и функциональных свойствах вирусных белков, полипептидной специфичности антител в сыворотке крови свиней после введения аттенуированных или вирулентных штаммов вируса АЧС (ASFV), последствиях иммунизации свиней выделенными из зараженных клеток или рекомбинантными белками в качестве потенциально протективных рассматривают белки р30, р54 и CD2v. Белки р30 и р54 функционально важны для прикрепления ASFV к клетке-мишени. Антитела к р54 блокируют связывание вириона с макрофагом, тогда как антитела к р30 ингибируют проникновение вириона в клетку. Белок CD2v обуславливает гемадсорбирующие свойства вируса (12-14).

Изучение иммуногенных и протективных свойств ДНК-конструкций, содержащих гены вирусных белков р30, р54 и CD2v, подтвердили важную роль клеточного иммунитета в формировании специфической защиты от АЧС, что открывает перспективы для разработки препаратов нового поколения (15-17).

Ранее мы сообщали о получении рекомбинантных плазмид рСI-neo/ASFV/p30, рСI-neo/ASFV/p54, рСI-neo/ASFV/CD2v. Расчетные молекулярные массы немодифицированных рекомбинантных белков составили 21,6 кДа (рр30), 18,7 кДа (рр54) и 28,6 кДа (rCD2v). По результатам иммуноблоттинга, в перевиваемой культуре клеток НЕК-293Т молекулярная масса антигенно активных продуктов трансляции рСI-neo/ASFV/p30 составила 21,6 кДа, рСI-neo/ASFV/p54 — 20,9 кДа и 36,3 кДа (18). По данным Р. Gumez-Puertas с соавт. (19) и F. Rodriguez с соавт. (20), масса мономера полноразмерного р54 — 24-28 кДа. В клетках НЕК-293Т, трансфицированных рСI-neo/ASFV/CD2v, транслированные вирусоспецифические полипептиды имели молекулярные массы 28,8; 39,8; 63,1 и 104,7 кДа. Первый из них по размеру соответствовал расчетной немодифицированной молекуле rCD2v. Остальные, по-видимому, представляли собой формы, в разной степени модифицированные в процессе гликозилирования и тримминга. Эти результаты в основном соответствуют данным L.C. Goateley и L.K. Dixon (21), которые в клетках Vero, трансфицированных плазмидой SV5CD2vHA, идентифицировали полипептиды рекомбинантного CD2v с молекулярными массами 26; 63; 89 и 104 кДа.

В представляемой работе мы иммунизировали животных А-клетками аутологичной культуры ЛС, трансфицированными *in vitro* рекомбинантными плазмидами, для повышения эффективности индукции противоклеточных механизмов защиты от АЧС, однако, как оказалось, при этом не удалось достигнуть протективности.

Цель нашего исследования — определить антигенность, иммуногенность и протективность продуктов трансляции рекомбинантных плазмид рСI-neo/ASFV/p30, рСI-neo/ASFV/p54, рСI-neo/ASFV/CD2v.

*Методика.* Домашних свиней породы крупная белая массой 20-25 кг получали из сектора подготовки подопытных животных ФГБНУ ФИЦВиМ. Использовали перевиваемую клеточную линию НЕК-293Т (Human Embryonic Kidney 293) из музея культур клеток ФГБНУ ФИЦВиМ и полученную

первичную культуру лейкоцитов крови свиньи. Вирулентный штамм ASFV Мозамбик-78 (М-78) и его аттенуированный дериват — штамм МК-200 были взяты из Государственной коллекции микроорганизмов ФГБНУ ФИЦВиМ (22).

Для приготовления культуры ЛС у каждого животного брали кровь (30–40 см<sup>3</sup>) из краниальной полой вены, для стабилизации крови использовали гепарин (20 ед/см<sup>3</sup>). Кровь выдерживали 50–60 мин при температуре 37 °С и собирали верхнюю фракцию, состоящую из плазмы и лейкоцитов. Ее центрифугировали при 2000 g 15 мин, супернатант сливали, а осадок ресуспендировали до получения посевного материала лейкоцитов (4 млн/см<sup>3</sup>) в среде Игла МЕМ с 10 % гомологичной инактивированной (30 мин при 56 °С) сыворотки крови, пенициллином (100–200 ЕД/см<sup>3</sup>) и стрептомицином (100–200 мг/см<sup>3</sup>). Клетки культивировали в 6-луночных планшетах в СО<sub>2</sub>-инкубаторе при 37 °С. За 1 ч до постановки трансфекции 2-суточную культуру клеток ЛС переводили на бессывороточную среду.

Трансфекцию клеток ДНК-конструкциями проводили в течение 6–8 ч с применением Lipofectamine® («Thermo Fisher Scientific», США) по стандартному протоколу. Затем заменяли среду культивирования на среду Игла МЕМ с 10 % гомологичной свиной сыворотки и инкубировали 2–3 сут.

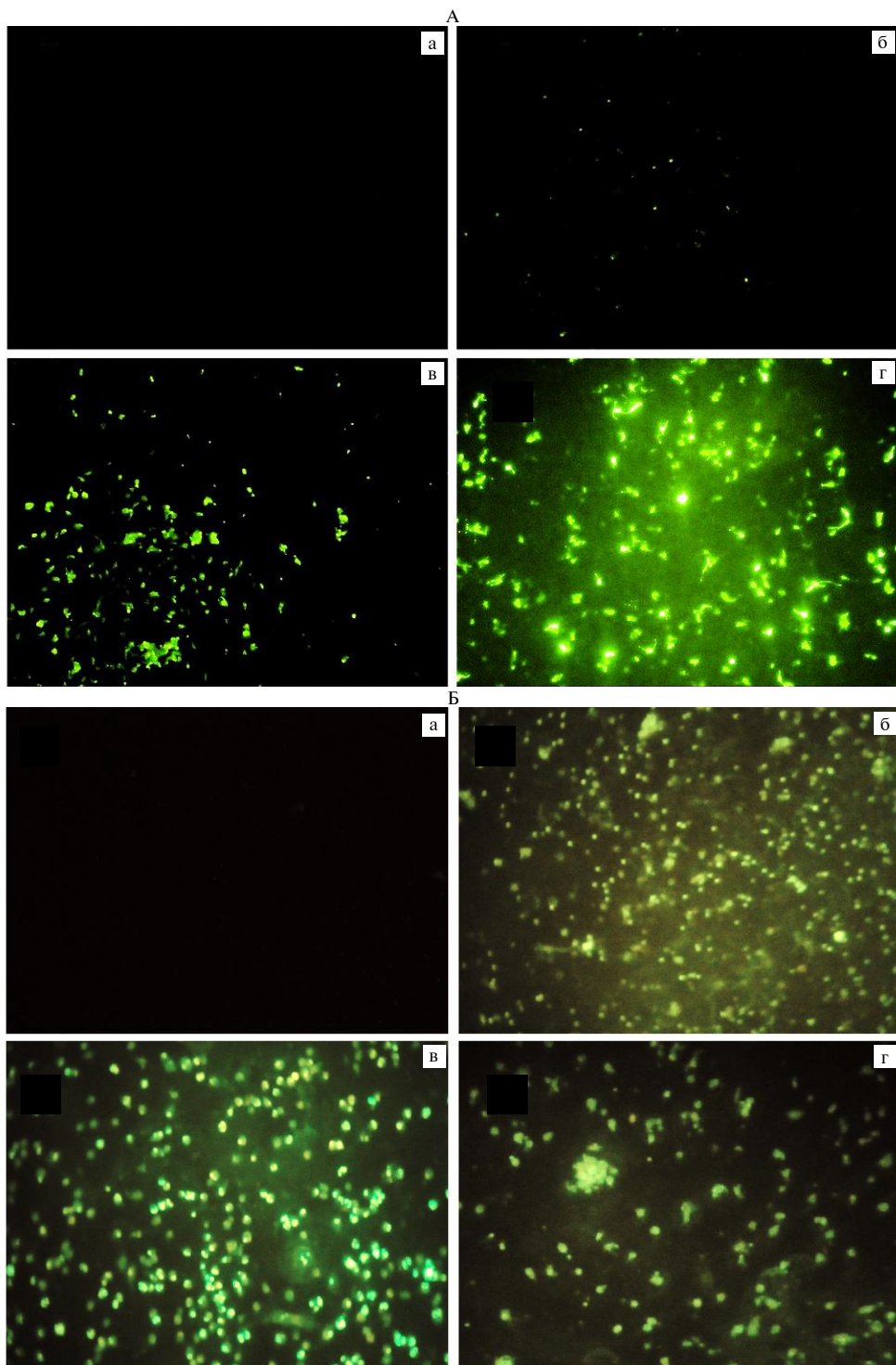
Анти-ASFV положительные сыворотки получали по следующей схеме: домашним свиньям внутримышечно вводили ASFV штамм МК-200, в дозе 6,5 lg ГАЕ<sub>50</sub> (0-е сут). На 17-е сут этих свиней заражали внутримышечно штаммом ASFV М-78 в дозе 10<sup>3</sup> ГАЕ<sub>50</sub>. В периоды проявления клинических признаков заболевания (гипертермия, отказ от корма, геморагии на ушах и брюхе) больных животных лечили введением внутримышечно ежедневно по 100 мг/кг фосфонуксусной кислоты до восстановления нормальной температуры тела (3–5 сут). Тотальное обескровливание свиней проводили на 38-е сут после начала эксперимента.

Получение меченных изотиоцианатом флуоресцеина (FITC) иммуноглобулинов из сывороток иммунных к АЧС свиней (анти-ASFV FITC-иммуноглобулинов) и постановку реакции прямой иммунофлуоресценции осуществляли по ГОСТ 28573-90 «Свиньи. Методы лабораторной диагностики африканской чумы». Результаты учитывали при люминесцентной микроскопии на флуоресцентном микроскопе Eclipse E200 («Nikon Corp.», Япония). Сыворотки крови свиней исследовали на наличие антител к белкам ASFV методами непрямого твердофазного иммуноферментного анализа (ТФ ИФА) и иммуноблоттинга (23, 24).

*Результаты.* В работе использовали полученные нами ранее экспрессирующие ДНК-конструкции (pCI-neo/ASFV/p30, pCI-neo/ASFV/p54, pCI-neo/ASFV/CD2v) с фрагментами генов *CP204L*, *E183L*, *EP402R* ASFV штамма МК-200 III сероиммунотипа (18).

Антигенную активность рекомбинантных белков, продуцируемых этими ДНК-конструкциями, изучали в культурах клеток НЕК-293Т и ЛС. Покровные стекла с трансфицированными клетками отбирали ежедневно и методом прямой иммунофлуоресценции определяли продукцию антигенно активных рекомбинантных белков. Максимум экспрессии в клетках НЕК-293Т и ЛС, трансфицированных pCI-neo/ASFV/p30, pCI-neo/ASFV/p54 или pCI-neo/ASFV/CD2v, наблюдали на 2–3-и сут (рис. 1).

Особенность схемы иммунизации свиней состояла в том, что ее проводили на 0-е, 14-е, 28-е сут с использованием А-клеток аутологичной культуры ЛС, трансфицированных *in vitro* используемыми рекомбинантными плазмидами. Предполагалось, что иммунизация антигенпредставляющи-



**Рис. 1.** Динамика синтеза антигенно активных продуктов трансляции в клетках перевиваемой линии НЕК-293Т (А) и первичной культуры лейкоцитов свиньи (Б), трансфицированных рекомбинантной плазмидой рС1-нео/ASFV/р30: а, б, в, г — соответственно 0, 1, 2, 3 сут после трансфекции (люминесцентная микроскопия, Eclipse E200, «Nikon Corp.», Япония, увеличение  $\times 100$ ).

ми клетками (макрофагами) обеспечит эффективную индукцию противоклеточных механизмов защиты против АЧС. Для этого за 4 сут до иммуни-

зации от свиной №№ 1-4 получали по 90 см<sup>3</sup> культуры клеток ЛС. На 2-е сут культивирования в них вносили по 90 мкг pCI-neo/ASFV/p30 (№ 1), pCI-neo/ASFV/p54 (№ 2) или pCI-neo/ASFV/CD2v (№ 3). От свиной № 4 90 см<sup>3</sup> культуры ЛС делили на три части по 30 см<sup>3</sup> и трансфицировали каждую одной из трех конструкций (pCI-neo/ASFV/p30, pCI-neo/ASFV/p54 или pCI-neo/ASFV/CD2v), внося по 30 мкг плазмидной ДНК. Через 2 сут культуральные среды с не прикрепившимися клетками ЛС сливали, а монослой трансфицированных (около 10<sup>7</sup> А-клеток) механически снимали с подложки, отмывали при 2000 g 10 мин, ресуспендировали в 3 см<sup>3</sup> фосфатного буферного раствора (рН 7,2) и вводили в центральную ушную вену соответствующим аутологичным свиньям. За животными вели клиническое наблюдение с ежедневным измерением температуры тела. Методами непрямого ТФ ИФА и иммуноблоттинга мы не обнаружили в крови иммунизированных свиной антител к белкам ASFV на 0-е, 14-е, 28-е и 42-е сут. После контрольного заражения на 42-е сут штаммом М-78 ASFV в область шеи в дозе 10<sup>2</sup> ГАЕ<sub>50</sub> четыре иммунизированные свиной пали через 6-8 сут, а не иммунизированная (контрольная) — через 13 сут (рис. 2).



Рис. 2. Динамика температуры тела у свиной, иммунизированной разными рекомбинантными белками ASFV (1-4), в период от заражения до гибели и у контрольного животного (5) после экспериментального заражения вирулентным штаммом ASFV Мозамбик-78: 1 — p30, 2 — p54, 3 — CD2v, 4 — p30, p54 и CD2v.

ские признаки (25). Заболевание у контрольного животного (№ 5) характеризовалось потерей аппетита с одновременным угнетением и повышением температуры тела до 41,2-41,3 °C, парезами и параличами задних конечностей. Отмечали выраженный цианоз кожных покровов в области ушей, брюха, конечностей и промежности. Патологоанатомическая картина была характерна для АЧС.

Существенным недостатком кандидатных ДНК-вакцин считается относительно низкая индукция иммунных реакций, особенно у крупных млекопитающих. Для преодоления этой проблемы применительно к АЧС испытано несколько подходов: нацеливание (таргетинг), убиквитинирование, иммунизация библиотеками экспрессии и вирусы VacMam (26). Первые попытки индуцировать защитный иммунный ответ против ASFV с использованием ДНК-конструкции, кодирующей два вирусных белка — p54 и p30 в виде химерного протеина (PQ), оказались неудачными. ДНК-конструкции, кодирующие только PQ, обеспечивали высокую продукцию антител у иммунизированных мышей, но не у свиной (8).

Иммунизация ДНК-конструкцией pCMV-sHAPQ, дополненной геном белка CD2v (HA), индуцировала у свиной гуморальный иммунный ответ, однако особи не были защищены от контрольного заражения, показывая клинические признаки АЧС и кинетику виремии, неотличимые от

Свиной, которую иммунизировали А-клетками ЛС, трансфицированными конструкцией pCI-neo/ASFV/p30 (№ 1), пала через 6 сут без клинических признаков и при отсутствии патологоанатомических проявлений. У остальных иммунизированных животных наблюдали повышение температуры тела, гибель на 7-8-е сут, а также характерные для АЧС патологоанатомические

таковых у контрольных животных. Для того чтобы избежать нежелательной индукции антител и усилить специфические CD8<sup>+</sup>-Т-клеточные ответы, была разработана конструкция рCMV-UbsHAPQ, кодирующая антигенные детерминанты р30, р54 и CD2v, слитые с клеточным убиквитином (Ubs). Двукратная иммунизация рCMV-UbsHAPQ не индуцировала гуморальный ответ у свиней, но обеспечивала частичную защиту против контрольного заражения ASFV, подтверждая важность Т-клеточного ответа в защите от этого вируса. Четырехкратная иммунизация рCMV-UbsHAPQ стимулировала образование антител к р30 и р54, что приводило, помимо, к снижению протективного эффекта CD8<sup>+</sup>-Т-клеток (16). Не исключено, что более ранняя (по сравнению с контрольным животным) гибель иммунизированных свиней в нашем опыте обусловлена индукцией вирусоспецифических антител в титрах, недостаточных для обнаружения методами непрямого ТФ ИФА и иммуноблоттинга.

Таким образом, методом иммунофлуоресценции доказана экспрессия ASFV-специфических продуктов трансляции в клетках НЕК-293Т и лейкоцитах свиней, трансфицированных рекомбинантными плазмидами рCI-нео/ASFV/р30, рCI-нео/ASFV/р54 и рCI-нео/ASFV/CD2v. Иммунизация свиней аутологичными лейкоцитами свиней, трансфицированными рекомбинантными плазмидами рCI-нео/ASFV/р30, рCI-нео/ASFV/р54 или рCI-нео/ASFV/CD2v, не индуцировала выработку вирусоспецифических антител и защиту от контрольного заражения.

*ФГБНУ Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии,*  
601125 Россия, Владимирская обл., Петушинский р-н,  
пос. Вольгинский, ул. Академика Бакулова, стр. 1,  
e-mail:almazlcf@yandex.ru, olgadubrovskaya@list.ru,  
lady\_d.morozova@mail.ru, diagnoz3@yandex.ru, sereda-56@mail.ru ☒

*Поступила в редакцию  
16 апреля 2018 года*

*Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2018, V. 53, № 4, pp. 860-867*

## THE STUDY OF ANTIGENICITY, IMMUNOGENICITY AND PROTECTIVE POTENTIAL OF DNA CONSTRUCTS CONTAINING FRAGMENTS OF GENES CP204L, E183L OR EP402R OF AFRICAN SWINE FEVER VIRUS STRAIN MK-200

*A.R. Imatdinov, O.A. Dubrovskaya, D.Yu. Morozova, V.M. Lyska, A.D. Sereda*

*Federal Research Center for Virology and Microbiology, Federal Agency of Scientific Organizations, 1, ul. Akademika Bakuleva, pos. Vol'ginskii, Petushinskii Region, Vladimir Province, 601125 Russia, e-mailalmazlcf@yandex.ru, olgadubrovskaya@list.ru, lady\_d.morozova@mail.ru, diagnoz3@yandex.ru, sereda-56@mail.ru ☒ corresponding author*

*ORCID:*

*Imatdinov A.R. orcid.org/0000-0003-2889-6112  
Dubrovskaya O.A. orcid.org/0000-0002-3168-7947  
Morozova D.Yu. orcid.org/0000-0001-5486-9981*

*Lyska V.M. orcid.org/0000-0001-5302-3108  
Sereda A.D. orcid.org/0000-0001-8300-5234*

*The authors declare no conflict of interests*

*Acknowledgements:*

*Supported financially by Russian Science Foundation (the research project "Design of African swine fever virus candidate vaccine based on chimeric viruses" No 16-16-00090)*

*Received April 16, 2018*

*doi: 10.15389/agrobiol.2018.4.860eng*

### Abstract

African swine fever (ASF) is a viral, contagious and septic disease affecting wild and domestic pigs of all breeds and age groups. In both domestic pigs and wild European boars affected, some hyperacute or acute forms of the infection are observed which are characterized by fever, signs of toxicosis, hemorrhagic diathesis with mortality rates of up to 100 %. In endemic regions (e.g., some countries of East Africa), a subacute form of the disease with a mortality of 30 to 70 %, as well as a chronic one with very low mortality levels are reported (S. Blome et al., 2013; C. Gabriel et al., 2011; JM Sánchez -Vizcaino et al., 2015). No vaccine against African swine fever is currently available, and the research works aimed at the development of live, inactivated and subunit vaccines have not achieved the intended result yet (P.J. Sánchez-Cordón et al., 2017; V. O'Donnell et al., 2016;

S. Blome et al., 2014). Nevertheless, the opportunity of obtaining a DNA vaccine using the genes of potentially protective ASFV proteins p30, p54 and/or CD2v is considered to be a promising option in a number of laboratories worldwide. The proteins p30 and p54 are functionally important in attaching the ASF virus to the target cell. The antibody to p54 blocks the virion binding to the macrophage, whereas the antibody to p30 inhibits the virion penetration into the cell. The protein CD2v determines the hemadsorbing properties of the virus (S.D. Kollnberger et al., 2002; M.G. Barderas et al., 2001; J.G. Neilan et al., 2004). This work has been performed to study effects of the translation products of recombinant plasmids pCI-neo/ASFV/p30, pCI-neo/ASFV/p54 and pCI-neo/ASFV/CD2v induced in adhesive cells (A-cells) after transfection. The antigenic activity of the recombinant proteins produced with these DNA constructs was compared in permanent cell line HEK-293T and swine leukocyte (SL) autologous primary cultures using a direct fluorescence technique. The highest expression of the antigen-active translation products in HEK-293T and SL cells transfected with pCI-neo/ASFV/p30, pCI-neo/ASFV/p54 or pCI-neo/ASFV/CD2v was observed on day 2. The peculiarity of the pig immunization schedule applied was that the animals were thrice immunized at a 14-day interval with autologous LS A cells transfected in vitro with the above recombinant plasmids. For this, as much as 90 cm<sup>3</sup> of LC cell culture was produced using blood samples from each of the animals No.No. 1-4. On day 2 of the culturing, 90 µg of pCI-neo/ASFV/p30 (No. 1), pCI-neo/ASFV/p54 (No. 2) or pCI-neo/ASFV/CD2v (No. 3) was added thereto. The LS culture obtained from the pig No. 4 in a volume of 90 cm<sup>3</sup> was divided into three portions of 30 cm<sup>3</sup>, and each one was transfected with one of the three constructs (i.e., pCI-neo/ASFV/p30, pCI-neo/ASFV/p54 or pCI-neo/ASFV/CD2v) by adding 30 µg of the plasmid DNA. Two days later, the pigs No. 1 to No. 4 were inoculated into the central auricular vein with about 10<sup>7</sup> autologous transfected A-cells of LS cultures. On days 14, 28 and 42, no antibody against ASFV proteins was detected in the blood of the immunized pigs using indirect solid-phase ELISA and immunoblotting. After the pigs were infected into the neck with 10<sup>2</sup> HAU<sub>50</sub> of an ASFV strain Mozambique-78 on day 42, the four pre-immunized pigs (No.No. 1-4) died on day 6 to 8 and the control one died (No. 5) on day 13. Thus, the immunization of pigs with the autologous and antigenically active LS cells transfected with the recombinant plasmids pCI-neo/ASFV/p30, pCI-neo/ASFV/p54 or pCI-neo/ASFV/CD2v failed to provide antibody response or protection against the challenge.

Keywords: African swine fever, ASFV, recombinant plasmids, ASFV proteins p30, p54 and CD2v, antigenicity, immunogenicity.

## REFERENCES

1. Blome S., Gabriel C., Beer M. Pathogenesis of African swine fever in domestic pigs and European wild boar. *Virus Res.*, 2013, 173(1): 122-130 (doi: 10.1016/j.virusres.2012.10.026).
2. Gabriel C., Blome S., Malogolovkin A., Parilov S., Kolbasov D., Teifke J.P., Beer M. Characterization of African swine fever virus Caucasus isolate in European wild boars. *Emerg. Infect. Dis.*, 2011, 17(12): 2342-2345 (doi: 10.3201/eid1712.110430).
3. Sánchez-Vizcaíno J.M., Mur L., Gomez-Villamandos J.C., Carrasco L. An update on the epidemiology and pathology of African swine fever. *J. Comp. Pathol.*, 2015, 152(1): 9-21 (doi: 10.1016/j.jcpa.2014.09.003).
4. Sánchez-Cordón P.J., Chapman D., Jabbar T., Reis A.L., Goatley L., Netherton C.L., Taylor G., Montoya M., Dixon L. Different routes and doses influence protection in pigs immunised with the naturally attenuated African swine fever virus isolate OURT88/3. *Antiviral Res.*, 2017, 138: 1-8 (doi: 10.1016/j.antiviral.2016.11.021).
5. O'Donnell V., Holinka L.G., Sanford B., Krug P.W., Carlson J., Pacheco J.M., Reese B., Risatti G.R., Gladue D.P., Borca M.V. 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.*, 2016, 221: 8-14 (doi: 10.1016/j.virusres.2016.05.014).
6. Blome S., Gabriel C., Beer M. Modern adjuvants do not enhance the efficacy of an inactivated African swine fever virus vaccine preparation. *Vaccine*, 2014, 32(31): 3879-3882 (doi: 10.1016/j.vaccine.2014.05.051).
7. Lacasta A., Ballester M., Montegudo P.L., Rodríguez J.M., Salas M.L., Accensi F., Pina-Pedrero S., Bensaïd A., Argilaguet J., Lypez-Soria S., Hutet E., Le Potier M.F., Rodríguez F. Expression library immunization can confer protection against lethal challenge with African swine fever virus. *J. Virol.*, 2014, 88(22): 13322-13332 (doi: 10.1128/JVI.01893-14).
8. Argilaguet J.M., Pérez-Martín E., Nofrarías M., Gallardo C., Accensi F., Lacasta A., Mora M., Ballester M., Galindo-Cardiel I., Lypez-Soria S., Escribano J.M., Reche P.A., Rodríguez F. 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).
9. Sereda A.D., Kazakova A.S., Imatdinov A.R., Kolbasov D.V. Humoral and cell immune mechanisms under African swine fever (review). *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya [Agricultural Biology]*, 2015, 50(6): 709-718 (doi: 10.15389/agrobiology.2015.6.709eng).

10. Lacasta A., Monteagudo P.L., Jiménez-Marín B., Accensi F., Ballester M., Argilagué J., Galindo-Cardiel I., Segalés J., Salas M.L., Domínguez J., Moreno B., Garrido J.J., Rodríguez F. Live attenuated African swine fever viruses as ideal tools to dissect the mechanisms involved in viral pathogenesis and immune protection. *Vet. Res.*, 2015, 46: 135 (doi: 10.1186/s13567-015-0275-z).
11. Takamatsu H.H., Denyer M.S., Lacasta A., Stirling C.M., Argilagué J.M., Netherton C.L., Oura C.A., Martins C., Rodríguez F. Cellular immunity in ASFV responses. *Virus Res.*, 2013, 173(1): 110-121 (doi: 10.1016/j.virusres.2012.11.009).
12. Kollnberger S.D., Gutierrez-Castaceda B., Foster-Cuevas M., Corteyn A., Parkhouses R.M.E. Identification of the principal serological immunodeterminants of African swine fever virus by screening a virus cDNA library with antibody. *J. Gen. Virol.*, 2002, 83: 1331-1342 (doi: 10.1099/0022-1317-83-6-1331).
13. Barderas M.G., Rodríguez F., Gomez-Puertas P., Aviles M., Beitia F., Alonso C., Escribano J.M. Antigenic and immunogenic properties of a chimera of two immunodominant African swine fever virus proteins. *Arch. Virol.*, 2001, 146: 1681-1691 (doi: 10.1007/s007050170056).
14. Neilan J.G., Zsak L., Lu Z., Burrage T.G., Kutish G.F., Rock D.L. Neutralizing antibodies to African swine fever virus proteins p30, p54, and p72 are not sufficient for antibody-mediated protection. *Virology*, 2004, 319: 337-342 (doi: 10.1016/j.virol.2003.11.011).
15. Ruiz-Gonzalvo F., Rodríguez F., Escribano J.M. Functional and immunological properties of the baculovirus-expressed hemagglutinin of African swine fever virus. *Virology*, 1996, 218: 285-289 (doi: 10.1006/viro.1996.0193).
16. Takamatsu H.H., Denver M.S., Lacasta A., Stirling C.M., Argilagué J.M., Netherton C.L., Oura C.A., Martins C., Rodríguez F. Cellular immunity in ASFV responses. *Virus Res.*, 2013, 173(1): 110-121 (doi: 10.1016/j.virusres.2012.11.009).
17. Argilagué J.M., Pérez-Martín E., López S., Goethe M., Escribano J.M., Giesow K., Keil G.M., Rodríguez F. BacMam immunization partially protects pigs against sublethal challenge with African swine fever virus. *Antiviral Res.*, 2013, 98(1): 61-65 (doi: 10.1016/j.antiviral.2013.02.005).
18. Imatdinov A.R., Sereda A.D., Imatdinov I.R., Kazakova A.S., Dubrovskaya O.A., Kolbasov D.V. Expression of recombinant genes encoding fragments of the protective important proteins of African swine fever virus in eucaryotic cells. *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya [Agricultural Biology]*, 2016, 51(6): 837-844 (doi: 10.15389/agrobiology.2016.6.837eng).
19. Gómez-Puertas P., Rodríguez F., Oviedo J.M., Brun A., Alonso C., Escribano J.M. 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*, 1998, 243: 461-471 (doi: 10.1006/viro.1998.9068).
20. Rodríguez F., Alcaraz S., Yanez R.J., Rodríguez J.M., Alonso C., Rodríguez J.F., Escribano J.M. Characterization and molecular basis of heterogeneity of the African swine fever virus envelope protein p54. *J. Virol.*, 1994, 68(11): 7244-7252.
21. Goatley L.C., Dixon L.K. Processing and Localization of the African swine fever virus CD2v transmembrane protein. *J. Virol.*, 2011, 85(7): 3294-3305 (doi: 10.1128/jvi.01994-10).
22. Malogolovkin A., Burmakina G., Titov I., Sereda A., Gogin A., Baryshnikova E., Kolbasov D. Comparative analysis of African swine fever virus genotypes and serogroups. *Emerg. Infect. Dis.*, 2015, 21(2): 312-315 (doi: 10.3201/eid2102.140649).
23. Strizhakova O.M., Lyska V.M., Malogolovkin A.S., Novikova M.B., Sidlik M.V., Nogina I.V., Shkaev A.E., Balashova E.A., Kurinnov V.V., Vasil'ev A.P. Validation of an ELISA kit for detection of antibodies against ASF virus in blood or spleen of domestic pigs and wild boars. *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya [Agricultural Biology]*, 2016, 51(6): 845-852 (doi: 10.15389/agrobiology.2016.6.845eng).
24. *Immunoblotting OIE for serological diagnosis of African swine fever (SOP/CISA/ASF/IB/1/2008)*. Available <http://asf-referencelab.info/asf/images/files/SOPs/SOP-AFSIB12008.pdf>. No date.
25. Ryzhova E.V., Belyanin S.A., Kolbasov D.V., Balyshv V.M., Kurinnov V.V., Pronin V.V., Korneva G.V. *Rossiiskii veterinarnyi zhurnal*, 2012, 1: 10-14 (in Russ.).
26. Jancovich J.K., Chapman D., Hansen D.T., Robida M.D., Loskutov A., Craciunescu F., Borovkov A., Kibler K., Goatley L., King K., Netherton C.L., Taylor G., Jacobs B., Sykes K., Dixon L.K. 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): e02219-17 (doi: 10.1128/JVI.02219-17).