СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ БИОЛОГИЯ, 2022, том 57, № 4, с. 609-627

Обзоры, проблемы

УДК 636.4:619:578:577.2:571.27 doi: 10.15389/agrobiology.2022.4.609rus

СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПРОФИЛАКТИКЕ АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ*

(обзор)

Р.С. ЧЕРНЫШЕВ, А.В. СПРЫГИН, А.С. ИГОЛКИН, Т.В. ЖБАНОВА, Н.А. ПЕРЕВОЗЧИКОВА, Д.В. РОМЕНСКАЯ, К.Н. ГРУЗДЕВ, А. МАЗЛУМ✉

Африканская чума свиней (АЧС), впервые охарактеризованная R.E. Montgomery еще в начале XX века (R.E. Montgomery, 1921), уже более 100 лет остается одной из острых проблем в мировом свиноводстве. Поиски эффективных и универсальных средств специфической профилактики во всем мире ведутся с 1933 года (J. Walker, 1933). В представленном обзоре суммированы данные литературы из открытых источников по наиболее важным и успешным событиям в истории разработки вакцин против АЧС, обсуждены перспективы и результаты использования аттенуированных (C. Mucoz-Pérez с соавт., 2021), инактивированных (E. Cadenas-Fernández с соавт., 2021), субъединичных (J.G. Neilan с соавт., 2004) и векторных (J.K. Jancovich с соавт., 2018) вакцин против АЧС. При широком использовании природно ослабленных негемадсорбирующих изолятов в качестве вакцин во второй половине XX века в странах Европы наблюдалось хроническое течение АЧС у значительного числа свиней (J. Manso Ribeiro с соавт., 1963). Несмотря на генетические изменения в геноме вируса, последовательные пассажи полевых изолятов вируса АЧС на различных культурах клеток не показали должного результата в ослаблении вирулентных свойств возбудителя (I. Titov с соавт., 2017). Использование технологий получения делетированных мутантов ASFV-G-ΔI177L создало перспективу для разработки эффективных вакцин-кандидатов (M.V. Borca с соавт., 2020). Показано, что инактивированные, а также субъединичные вакцины на основе рекомбинантных белков, вызывали образование специфических иммуноглобулинов в высоких титрах, однако не обладали протективными свойствами (G. Burmakina с соавт., 2016). Новой вехой в борьбе с многими инфекционными болезнями животных, в частности с АЧС, стали векторные вакцины. Исследования последних лет указывают на перспективу создания эффективных и сертифицированных ДНК-вакцин, среди векторов для разработки которых хорошо себя зарекомендовали аденовирус человека 5 (rAd) и модифицированный вирус осповакцины Анкара (MVA) (L.C. Goatley с соавт., 2020). Аттенуированные вакцины на основе генетически модифицированных вирусов с делецией генов *I226R* и *18-7GD* (Y. Zhang с соавт., 2021; W. Chen с соавт., 2020) нуждаются в экспертизе с привлечением международных организаций для дальнейшей регистрации и внедрения в ветеринарную практику.

Ключевые слова: африканская чума свиней, АЧС, вакцина, инактивированная вакцина, аттенуированная вакцина, ДНК-вакцина, рекомбинантная вакцина, CRISPR/Cas9.

Африканская чума свиней (АЧС) — контагиозная, природно-очаговая, трансграничная болезнь домашних свиней и диких кабанов, которая может протекать сверхостро, остро, подостро, хронически и бессимптомно. Ее этиологический агент — содержащий двуцепочечную ДНК (dsDNA) оболочечный вирус (African swine fever virus — ASFV, род *Asfivirus*, семейство *Asfarviridae*) (1) (рис. 1).

Геном вируса состоит из 170-193 т.п.н. и содержит 151-167 открытых рамок считывания (ОРС) (2). Возбудитель имеет 9 сероиммунотипов, идентифицированных в реакции задержки гемадсорбции (РЗГАд) и в иммунопробе на восприимчивых животных, и 24 генотипа на основе вариабельности гена *B646L*, кодирующего капсидный белок vp72 (2-4). В связи с консервативностью последнего также проводится внутригенотиповая дифференциация изолятов вируса АЧС на основе анализа трех высоковариабельных генов — гена *B602L* (CVR), кодирующего неструктурный шаперон, ко-

* Работа поддержана грантом Министерства науки и высшего образования Российской Федерации на реализацию отдельных мероприятий Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий на 2019-2027 годы (Соглашение № 075-15-2021-1054).

торый участвует в сборке капсида, а также генов *E183L* и *CP204L*, кодирующих соответственно структурные белки vp54 и vp30 (5, 6).

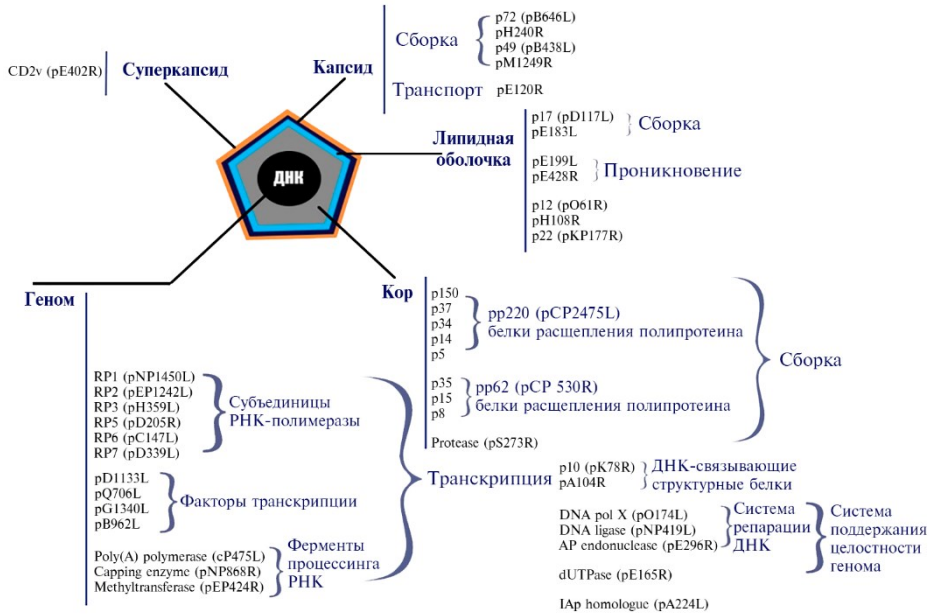

Рис. 1. Морфология вириона вируса африканской чумы свиней (1).

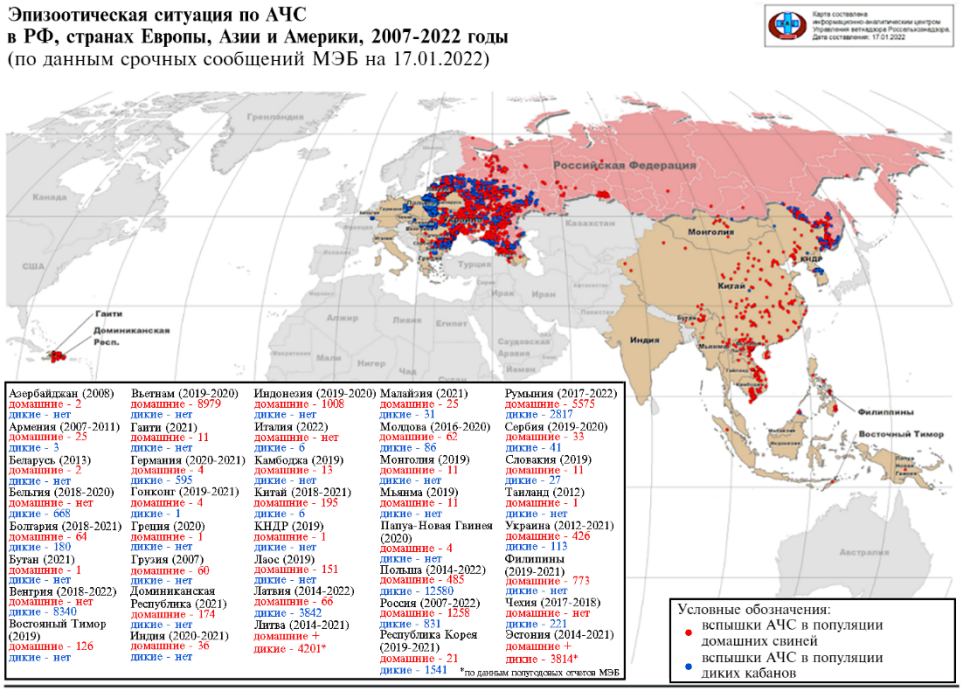

Рис. 2. Эпизоотическая ситуация по африканской чуме свиней (АЧС) **в мире, 2007-2022 годы (11).**

В XXI веке за относительно короткий период времени АЧС стала глобальной мировой проблемой. За последние 8 лет стремительное распространение инфекции в странах Европы (95 % очагов в популяции дикого кабана) и Юго-Восточной Азии (97 % очагов в популяции домашних свиней), ранее свободных от этой болезни, приняло катастрофический характер. В современной панзоотии АЧС (2007-2022) официально первые очаги

инфекции возникли на территории Грузии в начале 2007 года, когда контаминированная вирусом АЧС мясная продукция, доставленная в порт г. Поти на морских судах из стран Юго-Восточной Африки, была реализована среди местного населения. После этого в течение весенне-летнего сезона вокруг г. Поти регистрировали массовый падеж свиней, в том числе находившихся на свободном выгуле (7). В ноябре 2007 года была зарегистрирована первая вспышка АЧС на территории Российской Федерации в Чеченской Республике среди диких кабанов (8). В 2012 году очаги АЧС нотифицированы в Украине, в 2013 году — в Беларуси, в 2014 году — в Польше и Эстонии, в 2017 году — в Чехии, в 2018 году — в Венгрии, Бельгии и в Китае, в 2020 году — в Германии, в 2021 — в Малайзии, Республике Гаити и Доминиканской Республике (9, 10). По информации OIE, по данным на 2021 год АЧС зарегистрирована в 13 странах Европы и в 11 странах Азии (рис. 2) (11). В период с января 2020 года по ноябрь 2021 года общие потери от АЧС в Европе и Азии составили соответственно 1168354 и 373693 гол. домашних свиней (12).

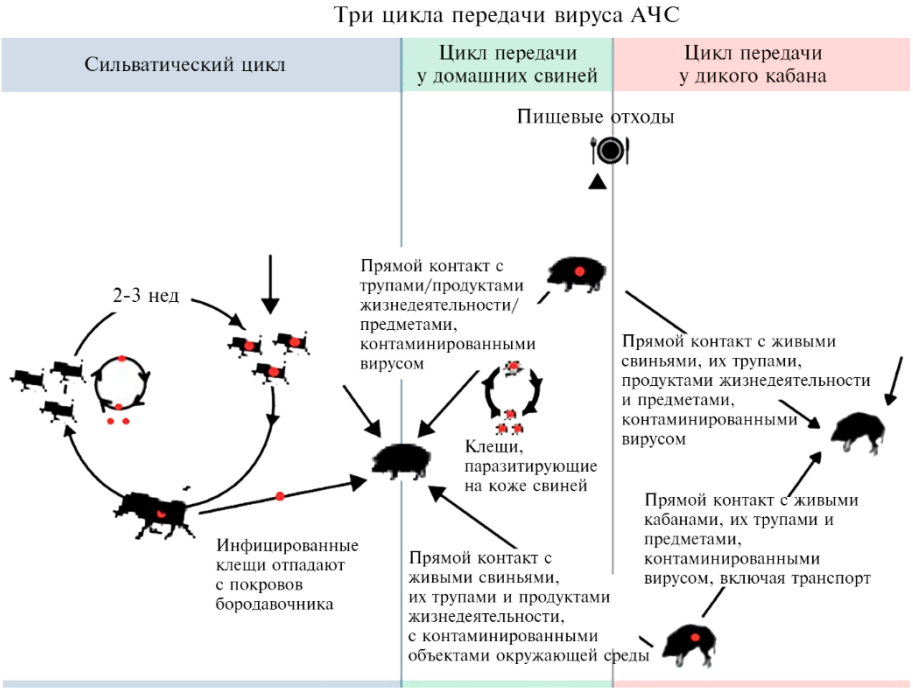

Рис. 3. Механизмы передачи вируса АЧС (13).

Механизм передачи вируса АЧС осуществляется по трем основным путям: через мягких клещей (сильватический цикл: страны Южной и Юго-Восточной Африки, о. Сардиния), контактная трансмиссия и алиментарное заражение, причем последние два включают участие как домашних свиней, так и диких кабанов (рис. 3) (13). В большинстве регионов Африки мутуалистические отношения между *Ornithodoros moubata* (клещ семейства *Argasidae*) и бородавочниками *Phacochoerus africanus* формируют устойчивый сильватический цикл, поддерживая тем самым циркуляцию вируса в природе (14). В условиях северного полушария дикие кабаны могут осуществлять передачу вируса домашним свиньям контактным путем (15). Дополнительно выделяют еще один механизм — антропогенный, связанный с активной деятельностью человека, в том числе с транспортировкой продукции свиноводства и охотничьего промысла, контаминированной вирусом АЧС,

ее попаданием в корм здоровых восприимчивых животных (16).

Отличительная особенность инфекции — образование большого количества антител, однако полной элиминации вируса из организма больного животного не происходит (17). Мало того, из-за наличия FCγ-рецептора у макрофага может наблюдаться антителозависимое усиление инфекции, приводящее к чрезмерному синтезу IL-10, и, как следствие, к активации Th2-клеток (16, 18-20). Экспериментально установлено, что роль антител заключается в снижении титров первичной виремии и, как следствие, в задержке проявления клинических признаков (21).

В связи со сложностью изучения механизма иммунных реакций в организме свиней в ответ на заражение вирусом АЧС, поиск подходов к разработке эффективных и безопасных средств специфической профилактики продолжается до настоящего времени (22). В последние годы в условиях беспрецедентного распространения АЧС в мире достигнут, к сожалению, незначительный прогресс в создании эффективной вакцины.

В связи с этим в своем обзоре мы рассмотрим вопросы, касающиеся современного положения дел в разработке аттенуированных, инактивированных и рекомбинантных вакцин против АЧС.

Роль клеточного и гуморального иммунитета в защите против АЧС. Большая часть имеющихся данных указывает на важнейшее значение NK-клеток в развитии иммунного ответа против АЧС. В исследовании in vitro установлено, что вирулентные изоляты вируса АЧС ингибируют активность NK-клеток (23). Высокий уровень цитотоксических CD8+ Т-лимфоцитов, которые уничтожают инфицированные макрофаги в организме, играет не менее значимую роль в иммунном ответе у свиней (24). Однако гипергаммаглобулинемия, а также повышенное содержание плазматических клеток и цитотоксических Т-лимфоцитов могут вызывать как специфическую иммуносупрессивную, так и опосредованную реакцию организма через IL-4 и IL-10 (25, 26). На сегодня наиболее эффективными показали себя аттенуированные вакцины, полученные при делеции определенных генов, и рекомбинантные вакцины, индуцирующие сильный клеточный иммунитет, который обусловлен ранней активностью NK-клеток и цитотоксических CD8+ Т-лимфоцитов. Основная сложность, связанная с использованием ДНК-вакцин, заключается именно в том, чтобы обеспечить формирование клеточного иммунитета, связанного с ранней активностью NK-клеток и цитотоксических CD8+ Т-лимфоцитов, что, безусловно, играет бóльшую роль, чем короткая сероконверсия к белкам вируса АЧС, которые экспрессируются в клетках хозяина (27).

В настоящее время известны работы, доказывающие существование вируснейтрализующих антител (17). Сыворотки реконвалесцентов, полученные после иммунизации свиней аттенуированным на культуре клеток CV-1 вариантом E75CV1-4, защищали животных от заражения исходным изолятом E75, а также изолятами E70, Lisbon 60, Malawi Lil 20/1 вируса АЧС в 86-97 % случаях (28). У свиней, пассивно иммунизированных очищенными иммуноглобулинами к вирусу АЧС, наблюдалась задержка первичной виремии в течение 3 сут по сравнению с контрольной группой животных (29). В исследовании вируснейтрализующей активности антител на культурах клеток Vero и альвеолярных макрофагов свиней показана 80 % нейтрализация меченного радиоактивным изотопом вируса АЧС, при этом его интернализация в клетки продолжалась (30). Антитела к цитоплазматическому динеин-домену DLC8 белка vp54 играли ведущую роль в нейтрализации вируса АЧС в культуре клеток Vero (31, 32). Несмотря на противоречивость

данных, полученных относительно как уровня, так и самого факта формирования гуморального иммунитета против вируса АЧС, большинство исследователей сходятся во мнении, что специфические антитела важны в реакции задержки гемадсорбции при повторном заражении вирусом АЧС и в задержке первичной виремии, однако они не играют протективной роли (17).

Аттенуированные вакцины. Аттенуированными называют вакцинные препараты на основе природно ослабленных (или аттенуированных) вирусов, полученных в лабораторных условиях посредством последовательных пассажей на чувствительных культурах клеток, а также при генетической модификации вирулентного вируса в результате делеции определенных генов.

Естественно аттенуированные вакцины. Первые данные об использовании аттенуированных вакцин были опубликованы в 1933 году J. Walker (33). Процент выживших свиней при иммунизации такими вакцинами был невысок, а введение интактным свиньям сывороток реконвалесцентов не защищало от заражения вирулентным вирусом. Автор тогда предположил, что низкая иммунная защита свиней от АЧС может быть связана с высокой антигенной изменчивостью изолятов из-за большого числа штаммов возбудителя по сравнению с вирусом классической чумы свиней (33). Впоследствии было установлено, что иммунизация аттенуированными вакцинами может защищать от заражения только изолятом гомологичного генотипа, тогда как при заражении гетерологичным изолятом вируса развивается клиническая картина АЧС (34, 35).

В опыте F. Boinas с соавт. (36) свиньям вводили природно аттенуированный изолят вируса АЧС OURT88/3 (генотип I), выделенный из клещей *Ornithodoros erraticus* семейства *Argasidae* и не проявляющий гемадсорбирующих свойств, с последующим заражением вирулентным гемадсорбирующим вирусом OURT88/1 (генотип I) в качестве штамма-пробойника. При этом ни виремии, ни клинических признаков АЧС у животных не отмечали. Однако после заражения таких свиней изолятом Lisbon 57 (генотип I) гибель всего поголовья произошла через 10-14 сут (36).

При заражении свиней негемадсорбирующим изолятом NH/P68 (генотип I), выделенным в 1968 году в Португалии от свиней с хронической формой АЧС, наблюдалось бессимптомное течение болезни, при этом регистрировали раннюю активность NK-клеток (с 7-х сут), позднюю виремию (после 14 сут) и высокий уровень специфических IgM, IgG1, IgG2 и IgA и цитотоксических Т-лимфоцитов, выявленных на 7-18-е сут после заражения. Свиньи, у которых наблюдали инаппарантнаю инфекцию, раннюю активность и высокое содержание NK-клеток, были устойчивы к заражению вирулентным изолятом АЧС L60 (генотип I). Однако у животных с хронической формой АЧС уровень NK-клеток был низким и приближался к таковому у свиней из контрольной группы (37, 38).

K. King с соавт. (39) иммунизировали свиней авирулентным изолятом OURT88/3, а затем исходным природно ослабленным низковирулентным штаммом OURT88/1 вируса АЧС. При заражении таких свиней вирулентными изолятами Benin 97/1 (генотип I) и гетерологичным Uganda 1965 (генотип X) уровень иммунной защиты составил соответственно 85,7 и 100 %. Более того, у 78 % иммунизированных свиней, которых заражали изолятом Benin 97/1, и у 50 % свиней, зараженных изолятом Uganda 1965, не наблюдали виремии и клинических признаков болезни (39).

При иммунизации свиней негемадсорбирующим естественно аттенуированным изолятом вируса АЧС Lv/17/WB/Rie1 (генотип II), выделенного от дикого кабана на территории Латвии в 2017 году, с последующим

контактом со свиньями, зараженными вирулентным вирусом Arm07 (генотип II), у 50 % животных опытной группы отмечали клинические признаки и виремию, а 50 % оставались клинически здоровыми, однако виремия у них сохранялась. При заражении свиней контрольной группы родственным гемадсорбирующим вирулентным изолятом Lv17/WB/Zieme3 гибель наступала на 12-е сут (40). Пероральная вакцинация диких кабанов штаммом Lv/17/WB/Rie1 показала 92 % иммунную защиту против контрольного заражения Arm07 (41). В настоящее время проходит оценка безопасности вакцины-кандидата на основе Lv/17/WB/Rie1 в популяции дикого кабана. Отмечен разный процент выживаемости животных при вакцинации и ревакцинации в дозах 10^3 ТЦД$_{50}$ и 10^4 ТЦД$_{50}$, что показывает важность дальнейших исследований этого прототипа вакцины (42).

Таким образом, естественно аттенуированные вакцинные варианты вируса АЧС демонстрируют широкую вариабельность в отношении протективных свойств даже против заражения изолятами гомологичного генотипа (17). Эта особенность препятствует разработке унифицированного препарата с широким спектром протективной активности.

Лабораторно аттенуированные вакцины. Культуральные вакцины. При аттенуации вирулентного изолята BA71 вируса АЧС (генотип I) провели 36 пассажей на макрофагах свиней с последующими 23 пассажами на перевиваемой культуре клеток Vero. В результате был получен вариант BA71V, который зарекомендовал себя в качестве стандарта для титрования вируса АЧС по числу бляшкообразующих единиц (БОЕ), однако этот вариант не снижал летальность свиней при заражении (43).

Проведя 50 последовательных пассажей вирулентного изолята вируса АЧС K49 (генотип I) на перевиваемой культуре клеток эмбриональной почки свиньи (SPEV) и 262 пассажа на первичной культуре клеток костного мозга свиней, получили авирулентный штамм KK262. После двух введений KK262 свиньям опытной группы (в 1-е и 21-е сут) у 33 % животных наблюдалась виремия на 28-е сут, но при заражении исходным вирулентным изолятом K49 на 42-е сут с начала испытания все свиньи оставались живыми (44).

При изучении биологических свойств изолята Odintsovo 02/14 (генотип II), выделенного от дикого кабана, выполнили три последовательных пассажа вируса на культуре клеток костного мозга свиньи (КМС). Важно отметить, что исходный полевой изолят, выделенный из селезенки павшего дикого кабана, вызывал 87,5 % летальность у домашних свиней после введения изолята пяти животным внутримышечно в дозе 10 ГАдЕ$_{50}$ и пяти — интраназально в дозе 50 ГАдЕ$_{50}$ (27, 45). Адаптация изолята Odintsovo 02/14 на перевиваемой культуре клеток CV-1 в течение 30 последовательных пассажей (вирус назван АЧС/ВНИИЗЖ/CV-1/30) привела к снижению гемадсорбции с 40-50 до 20-30 эритроцитов, прикрепленных к инфицированной клетке. Заражение свиней таким вариантом показало снижение летальности до 16,7 % и устойчивость выживших животных к контрольному заражению вирулентным изолятом Arm 07 (46-48).

При адаптации изолята Georgia 2007/1 на культуре клеток Vero провели 110 пассажей. На 80-м пассаже вариант ASFV-G/VP80 показал сниженную в 10 раз способность реплицироваться в первично трипсинированной культуре клеток макрофагов свиней, а на 110-м пассаже у варианта ASFV-G/VP110 репликация снижалась в 10^5-10^6 раз. При иммунизации свиней вариантом ASFV-G/VP110 не отмечали клинических признаков болезни в течение 21 сут наблюдения. Однако контрольное заражение изолятом Georgia 2007/1 не показало эффективности подобной иммунизации, так

как у всех свиней проявились клинические признаки АЧС и регистрировалась гибель на 9-е сут (49).

Результаты проведенных исследований по лабораторной аттенуации полевых изолятов позволяют заключить, что, как правило, не происходит такого ослабления вирулентных свойств вируса АЧС, чтобы в дальнейшем применять его для безопасной иммунизации. Однако при разработке вакцин может оказаться успешной целевая модификация генов аттенуированных вариантов вируса АЧС с помощью методов молекулярной биологии.

Вакцины на основе генетически модифицированных вирусов. Один из новых перспективных подходов при получении безопасных аттенуированных вакцин предполагает делетирование специфических генов вируса АЧС, кодирующих белки, которые служат факторами вирулентности (22, 50). Однако в этом случае значительные трудности связаны с тем, что функции многих белков не изучены. Например, делеция гена *KI69R*, кодирующего тимидинкиназу, приводила к потере вирулентности у изолята Malawi Lil-20/1 (генотип VIII), но при этом сохраняла вирулентность у изолята Georgia 2007/1 (генотип II), что, по-видимому, объясняется компенсаторными мутациями в других участках генома (51, 52).

При удалении шести генов мультигенного семейства *MGF360* и *MGF505* у Georgia 2007/1 (*MGF505-1R*, *MGF360-12L*, *MGF360-13L*, *MGF360-14L*, *MGF505-2R*, *MGF505-3R*) происходит полное ослабление вирулентных свойств вируса. Иммунизация животных таким делетированным вариантом в дозах 10^2 и 10^4 ГАдЕ$_{50}$ не вызывала развития клинических признаков АЧС, а после контрольного заражения вирулентным штаммом Georgia 2007/1 не отмечалось признаков хронического течения болезни, однако на протяжении примерно 7,5 сут детектировалась умеренная виремия (53). При иммунизации вариантом Georgia 2007/1 с делецией гена *9GL*, кодирующего фосфорилазу, более высокий уровень защиты наблюдали при сочетании с делецией гена *UK* (*DP96R*) (50, 54). Однако при одновременной делеции генов *MGF360* и *MGF505*, кодирующих ингибиторы интерферона I типа, и *9GL* защитный эффект при иммунизации не наступал (55).

Свиньи, которых иммунизировали вариантом BA71ΔCD2 с делецией гена *EP402R*, полученным при гомологичной рекомбинации, оказались устойчивы к заражению исходным вирулентным изолятом BA71 (генотип I), а также вирулентными изолятами E75 (генотип I), Georgia 2007/1, RSA/11/2017 (генотип XIX), Ken06.Bus (генотип IX) (56, 57).

Делеция гена *DP148R* у изолята вируса АЧС Benin 97/1 (генотип I) приводила к полной потере вирулентности. У свиней, иммунизированных BeninΔDP148R, при внутримышечном заражении исходным изолятом отмечали 100 % защиты, тогда как при интраназальном этот показатель составил 83,3 % (58).

При иммунизации свиней вариантами NH/P68DA238L-COS7 с делецией гена *A238L,* NH/P68DA224L-COS7 с делецией гена *A224L*, NH/P68DEP153R-COS7 с делецией гена *EP153R* в дозе 10^6 ТЦД$_{50}$ и NH/P68DA276R-PAM в дозе 10^2 ТЦД$_{50}$ с последующим контрольным заражением 10 ГАдЕ$_{50}$ штаммом Arm07 ослабление вирулентных свойств было достигнуто только в случае удаления гена *A224L*. Иммунная защита при этом достигала 100 % (59).

В исследованиях по делетированию генов *MGF505-1R*, *MGF505-2R*, *MGF505-3R*, *MGF360-12L*, *MGF360-13L*, *MGF360-14L*, *EP402R*, *9GL*, *DP148R*, кодирующих семь различных белков, китайские ученые (60) получили модифицированный вариант вируса АЧС HLJ/18-7GD, после внутримышечной инокуляции которого свиньи оставались клинически здоровыми в

течение 3 нед наблюдения. При заражении свиней вирулентным изолятом HLJ/18 (генотип II) в дозе 200 ЛД$_{50}$ у животных, иммунизированных 10^3 ТЦД$_{50}$ HLJ/18-7GD, наблюдалась лихорадка в течение 3-9 сут с максимальным подъемом температуры до 42 °С, однако у свиней, иммунизированных 10^5 ТЦД$_{50}$ HLJ/18-7GD, незначительный подъем температуры до 40,7 °С регистрировался только в течение первых суток (60).

В 2020 году группа ученых из США опубликовала данные о 100 % защите поголовья свиней, иммунизированных аттенуированным вариантом ASFV-G-ΔI177L вируса АЧС, полученным из исходного вирулентного изолята ASFV-G (Georgia 2007/1) в результате делеции гена *I177L*, который до этого исследования не был типичен для таких экспериментов. В опытной группе свиньям вводили ASFV-G-ΔI177L в дозе 10^2 ГАдЕ$_{50}$, после чего регистрировали незначительные титры при виремии ($10^{1,8}$-10^5 ГАдЕ$_{50}$/см^3 на 4-е сут, пик при 10^4-$10^{7,5}$ ГАдЕ$_{50}$/см^3 на 11-е сут и последующее снижение до $10^{2,3}$-10^4 ГАдЕ$_{50}$/см^3 вплоть до 28-х сут) и отсутствие каких-либо клинических признаков АЧС в течение 28 сут наблюдения. Впоследствии таких свиней заражали 10^2 ГАдЕ$_{50}$ исходного изолята ASFV-G. В течение 21 сут у животных не было клинических признаков АЧС, виремия развивалась, титры не превышали таковые в первом периоде наблюдения, а в крови вирулентный вирус не детектировался методом ПЦР-РВ (qPCR) (61). Работа M.V. Borca с соавт. (61) – первое сообщение о формирования стерильного иммунитета против АЧС в истории изучения этой инфекции. При адаптации ASFV-G-ΔI177L на культуре клеток PIPEC (Plum Island porcine epithelial cells) был получен стабильный изолят ASFV-G-ΔI177L/ΔLVR с делецией генов *MGF* и *X69R*, защищающий 100 % свиней от заражения вирулентным ASFV-G, что может быть использовано при производстве универсальной вакцины против АЧС (62). В дальнейшем авторы показали эффективность экспериментальной вакцины на основе ASFV-G-ΔI177L при ороназальном введении, что имеет важнейшее значение с точки зрения перспектив иммунизации диких свиней (в особенности европейского кабана *Sus scrofa*). При одинаковой дозе с внутримышечной инокуляцией титры при виремии в случае ороназального введения были значительно меньше, тогда как титры IgG1, IgG2 и IgM сохранялись на том же уровне (63). Недавнее исследование показало, что экспериментальная вакцина на основе ASFV-G-ΔI177L успешно индуцировала иммунную защиту поголовья вьетнамских свиней от полевых изолятов вируса АЧС (генотип II) во Вьетнаме (64).

Аналогичные исследования проводились в КНР в 2021 году, где в качестве вакцины-кандидата использовался изолят SY18ΔI226R с делецией не описанного до этого функционального гена *I226R*, кодирующего консервативный белок pI226R, локализующегося в виросоме цитоплазмы клеток («вирусных фабриках»). После введения SY18ΔI226R одной группе свиней в дозе 10^4 ТЦД$_{50}$, другой — 10^7 ТЦД$_{50}$ у животных не отмечали повышения температуры тела выше 40,1 °С и каких-либо клинических признаков болезни. При заражении первой группы свиней исходным изолятом SY18 (генотип II) в дозе $10^{2,5}$ ТЦД$_{50}$ регистрировали 2-суточную лихорадку с максимальным повышением температуры до 41,4 °С. Во второй группе при заражении 10^4 ТЦД$_{50}$ SY18 за период наблюдения не отмечали лихорадки и иных клинических признаков АЧС. Выживаемость свиней в обеих группах составила 100 % (65).

Опубликованные данные по вакцинным препаратам на основе генетически модифицированного вируса АЧС, в том числе с указанием генов для редактирования и процента выживаемости после контрольного заражения, представлены в таблице 1. Здесь обобщены сведения о проведенных за

последнее десятилетие исследованиях по генетической модификации вируса АЧС с использованием наиболее охарактеризованных и изученных вирулентных изолятов (в частности, Georgia 2007, Benin, E75).

1. Генетически модифицированные варианты вируса африканской чумы свиней, использованные в качестве перспективных вакцин

Экспериментальный вирус АЧС	Удаленные гены	Контрольный изолят (генотип)	Инфицировано/выжило (протекция, %)	Ссылка
BA71ΔCD2 в дозе 10^6 ГАдЕ$_{50}$	*EP402R* (CD2v)	BA71 (I)	6/6 (100 %)	(56)
BA71ΔCD2 в дозе 10^3 ГАдЕ$_{50}$	*EP402R* (CD2v)	BA71 (I)	6/2 (33 %)	(56)
BA71ΔCD2 в дозе $3{,}3\times10^4$ или 10^6 ГАдЕ$_{50}$	*EP402R* (CD2v)	E75 (I)	12/12 (100 %)	(56)
BA71ΔCD2 в дозе 10^3 ГАдЕ$_{50}$	*EP402R* (CD2v)	E75 (I)	6/1 (17 %)	(56)
BA71ΔCD2 в дозе $3{,}3\times10^4$ или 10^6 ГАдЕ$_{50}$	*EP402R* (CD2v)	Georgia 2007/1 (II)	18/18 (100 %)	(56)
BA71ΔCD2 в дозе $3{,}3\times10^4$ или 10^6 ГАдЕ$_{50}$	*EP402R* (CD2v)	RSA/11/2017 (XIX)	6/5 (83,3 %)	(57)
BA71ΔCD2 в дозе $3{,}3\times10^4$ и 10^6 ГАдЕ$_{50}$	*EP402R* (CD2v)	Ken06.Bus (IX)	8/4 (50 %)	(57)
HLJ/18-7GD	*MGF505-1R*, *MGF505-2R*, *MGF505-3R*, *MGF360-12L*, *MGF360-13L*, *MGF360-14L*, *EP402R*, *9GL*, *DP148R*	HLJ/18 (II)	4/4 (100 %)	(60)
BeninΔDP148R	*DP148R*	Benin (I), внутримышечное заражение	11/11 (100 %)	(58)
BeninΔDP148R	*DP148R*	Benin (I), интраназальное заражение	6/5 (83,3 %)	(58)
ASFV-G-ΔI177L в дозе 10^2 ГАдЕ$_{50}$	*I177L*	Georgia 2007/1 (II)	10/10 (100 %)	(61)
ASFV-G-ΔI177L в дозе 10^4 ГАдЕ$_{50}$	*I177L*	Georgia 2007/1 (II)	5/5 (100 %)	(61)
ASFV-G-ΔI177L в дозе 10^6 ГАдЕ$_{50}$	*I177L*	Georgia 2007/1 (II)	5/5 (100 %)	(61)
ASFV-G-ΔI177L (ороназальная иммунизация)	*I177L*	Georgia 2007/1 (II)	10/10 (100 %)	(63)
SY18ΔI226R	*I226R*	SY18 (II)	10/10 (100 %)	(65)
Georgia 2007/1	*9GL* (*B119L*) и *UK* (*DP96R*)	Georgia 2007/1 (II)	5/5 (100 %)	(50)
Pr4Δ9GL	*9GL* (*B119L*)	Pr4 (XX)	4/4 (100 %)	(76)
NH/P68DA238L-COS7 в дозе 10^6 ТЦД$_{50}$	*A238L*	Arm07 (II)	4/0 (0 %)	(59)
NH/P68DA224L-COS7 в дозе 10^6 ТЦД$_{50}$	*A224L*	Arm07 (II)	4/4 (100 %)	(59)
NH/P68DEP153R-COS7 в дозе 10^6 ТЦД$_{50}$	*EP153R*	Arm07 (II)	4/0 (0 %)	(59)
NH/P68DA276R-PAM в дозе 10^2 ТЦД$_{50}$	*A276R*	Arm07 (II)	5/0 (0 %)	(59)
ASFV-G-ΔMGF в дозе 10^2 ГАдЕ$_{50}$	*MGF505-1R*, *MGF360-12L*, *MGF360-13L*, *MGF360-14L*, *MGF505-2R*, *MGF505-3R*	Georgia 2007/1 (II)	10/10 (100 %)	(55)
ASFV-G-ΔMGF в дозе 10^4 ГАдЕ$_{50}$	*MGF505-1R*, *MGF360-12L*, *MGF360-13L*, *MGF360-14L*, *MGF505-2R*, *MGF505-3R*	Georgia 2007/1 (II)	10/10 (100 %)	(55)

Видно (см. табл. 1), что благодаря биоинформатическому анализу генома вируса АЧС выбор генов-мишеней для делетирования с целью получения кандидатной вакцины расширился. При иммунизации свиней экспериментальными вирусами дозы варьировались от 10 до 10^6 ГАдЕ$_{50}$. Полу-

ченные к настоящему времени результаты свидетельствуют о том, что делеции по разным генам (например, *I177L*, *9GL* и *I226R*) снижают вирулентность вируса и обеспечивают достаточную защиту от повторного заражения. Протективность препарата может различаться в зависимости от генотипа исходного изолята, дозы иммунизации и даже способа введения вируса. Более того, делеция ряда генов может неодинаково влиять на вирулентность вируса и степень защиты от повторного заражения, зависящую исключительно от способа иммунизации. Такие результаты демонстрируют сложность определения наилучшего способа вакцинации при борьбе с АЧС.

Инактивированные вакцины. Инактивированными вакцинами называют биологические препараты, в которых под действием какого-либо химического вещества подавлена репликативная активность вируса. Попытки разработать эффективную инактивированную вакцину против АЧС по аналогии с другими инфекционными болезнями животных предпринимались одновременно с созданием аттенуированных вариантов вируса. Однако уже в 1967 году при исследовании иммунного ответа на инактивированную вакцину выяснилось, что у иммунизированных свиней не развивается устойчивость к заражению вирулентным изолятом (66). При иммунизации культуральной вакциной, инактивированной глицеральальдегидом, у некоторых животных отмечали устойчивость к повреждению селезенки, однако защитный иммунитет при заражении вирулентным изолятом вируса АЧС не формировался (67). Несмотря на первые неудачи, исследования продолжались. Так, при использовании инактивированного вируса АЧС, выделенного из экстракта селезенки больных свиней, и N-октилглюкозида в качестве адъюванта иммунизированные свиньи демонстрировали устойчивость к заражению гомологичным изолятом, но были чувствительны к гетерологичному изоляту (68). В 2021 году при инактивации вируса бинарным этиленимином при низких температурах использовались новые и чрезвычайно активные адъюванты (Silicaoil, mGNE и другие). Однако при заражении иммунизированных свиней вирулентным изолятом вируса АЧС протективный иммунитет не развивался (69).

В связи с однозначными результатами о нецелесообразности применения такого типа вакцин против АЧС проводятся контрольные эксперименты для доказательства того, что инактивированные вакцины против АЧС не имеют перспектив (70).

В итоге следует отметить, все подходы, использованные для разработки инактивированной вакцины, успехом не увенчались. Это, в свою очередь, поднимает ряд важных вопросов в отношении генетической и антигенной изменчивости вируса, требующей детального изучения.

Субъединичные вакцины. В конце 1990-х годов внимание ученых было сосредоточено на рекомбинантных белках, полученных в бакуловирусной системе экспрессии для иммунизации свиней против АЧС.

В эксперименте синтезированный таким способом белок CD2v вводили свиньям в разных дозах. После заражения свиней интактным вирусом наблюдалась временная задержка гемадсорбции и временная дозозависимая задержка развития инфекции, однако защитный иммунитет не формировался (71). При введении рекомбинантных белков vp12, vp30 и vp54 у свиней вырабатывались специфические иммуноглобулины, задерживающие проникновение вируса в хозяйские клетки-мишени, однако высокие титры антител не приводили к устойчивости свиней при заражении вирулентным вирусом АЧС (72, 73).

Использование химерного белка vp54/30, который получили при

экспресии гена *CP204L*, интегрированного в сайт рестрикции гена *E183L*, в бакуловирусной системе, в культуре клеток макрофагов свиней приводило к 50 % нейтрализации вируса АЧС специфическими антителами. Биопроба с иммунизацией химерным белком vp54/30 и последующим заражением изолятом E75 показала 100 % выживаемость свиней при хроническом течении АЧС (74). При использовании химерных белков CD2v и лектина типа C, кодируемого геном *EP153R*, была доказана роль специфических антител, защищающих от заражения гомологичным изолятом вируса АЧС (75).

В 2004 году проводился опыт на чувствительных животных для сравнения субъединичных вакцин и вакцин на основе генетически модифицированного вируса АЧС, при этом использовали две группы свиней: первую иммунизировали изолятом Pr4Δ9GL с делецией гена *B119GL*, второй вводили рекомбинантные белки vp30, vp54, vp72 и vp22, экспрессированные в бакуловирусной системе. После заражения исходным изолятом Pr4 (генотип XX) у животных из первой группы проявлялись клинические признаки АЧС и виремия с незначительным титром (2,9±0,6 ТЦД$_{50}$/мл), однако гибели не происходило, тогда как во второй группе виремия развивалась с задержкой на 2 сут, после чего титр вируса составил 9,1±0,3 ТЦД$_{50}$/мл, и на 8,5±0,5 сут после заражения наступала гибель животных (76). Такие данные поставили под сомнение существование вируснейтрализующих антител, участвующих в формировании иммунной защиты против АЧС.

2. Использованные прототипы субъединичных вакцин против африканской чумы свиней (АЧС)

Белки вируса АЧС	Система экспрессии	Степень защиты	Ссылка
vp12	Бакуловирус	Нет защиты	(73)
CD2v	Бакуловирус	Нет защиты	(71)
vp54 и vp30	Бакуловирус	Нет защиты	(73)
Химерный белок vp54/30	Бакуловирус	Выживаемость 100 % (2/2), хроническое течение АЧС	(74)
vp30, vp54, vp72 и vp22	Бакуловирус	Нет защиты	(76)
CD2v и лектин типа C	Бакуловирус	Частичная защита	(75)

Как показывает таблица 2, в качестве субъединичных вакцин-кандидатов для иммунизации свиней могут использоваться различные рекомбинантные белки, но почти при всех комбинациях белков добиться защиты иммунизированных животных от повторного заражения не удается, и все полученные к настоящему времени результаты малоперспективны. Единственным исключением оказался химерный белок vp54/30, иммунизация которым обеспечивала выживание свиней при контрольном заражении вирулентным изолятом, однако при этом АЧС принимала хроническое течение и вирус все еще выделялся из организма свиней. Подобные работы, связанные с использованием субъединичных вакцин в качестве кандидатных, пока также нельзя считать перспективными. Во многом это связано с малой изученностью многих антигенов, способных защитить свиней от заражения вирусом АЧС.

Рекомбинантные (векторные) вакцины. В связи с развитием генной инженерии и молекулярной биологии стала методически доступна разработка рекомбинантных вакцин, в том числе против АЧС, в которых в качестве вектора могут использоваться плазмиды и гетерологичные вирусы (77-79).

Например, при использовании плазмидной конструкции pCMV-UbsHAPQ, кодирующей химерные белки vp54, vp30 и CD2v, соединенные с убиквитином для увеличения возможности экспрессии совместно с молекулами MHC I класса на цитоплазматической мембране клеток-мишеней

свиней, как и ожидалось, отмечался высокий уровень цитотоксических CD8+ Т-лимфоцитов с пиком на 3-и сут после иммунизации. После заражения вирулентным изолятом Е75 наблюдалась частичная защита свиней от АЧС с летальностью 66,0 % (78). Плазмида BacMam-sHAPQ может применяться в качестве перспективного вектора для экспрессии белков vp54, vp30 и sHA, сочетание которых при иммунизации свиней показало высокий уровень цитокинов у четырех из шести животных (78).

При конструировании модифицированных аденовирусов для экспрессии белков вируса АЧС в аденовирусный геном икорпорировали гены *A151R*, *B119L*, *B602L*, *EP402RΔPRR*, *B438L*, *K205R* и *A104R* изолята Georgia 2007/1. В культуре клеток костного мозга свиней (КМС) такая рекомбинантная конструкция индуцировала высокий уровень γ-интерферона на 7-е сут после инокуляции, но из-за отсутствия испытаний на восприимчивых животных нельзя сделать вывод о наличии иммунной защиты против вирулентных изолятов АЧС (80). Иммунизация диких кабанов 35 антигенами вируса АЧС, экспрессированными с использованием в качестве вектора аденовируса человека 5, не показала иммунной защиты при контрольном заражении вирулентным изолятом Arm 07 (78).

Клонирование 47 антигенов вируса АЧС с использованием плазмид и вируса осповакцины в качестве векторов не дало значительных результатов в поиске рекомбинантных вакцин, так как при заражении иммунизированных рекомбинантным вариантом свиней вирулентным изолятом Georgia 2007/1 в дозе 10^4 ГАдЕ$_{50}$ у всех животных опытной группы наблюдалось острое течение болезни, несмотря на высокий уровень продукции γ-интерферона цитотоксическими CD8+ Т-лимфоцитами in vitro (6×10^5 клеток) (81).

В аналогичном исследовании вектором служила плазмида *Escherichia coli* pGEX 4T-1, в которой клонировали гены вируса АЧС в двух вариантах: в одном — кодирующие белки CD2v, vp32, vp72 и vp17, в другом — белки vp15, vp35, vp54 и vp17. Уровень γ-интерферона, синтезированного в сенсибилизированных рекомбинантным вариантом мононуклеарных клетках крови, едва превышал таковой в контрольной пробе, а при заражении иммунизированных свиней вирулентным изолятом Arm 07 вируса АЧС среди животных наблюдалась 100 % летальность (82).

Весьма обнадеживающие результаты показало исследование, в котором восемь генов вируса АЧС изолята OURT88/3 (*B602L*, *B646L*, *E183L*, *E199L*, *CP204L, F317L*, *EP153R*, *MGF505-5R*) инкорпорировали в векторы человеческого аденовируса 5 (rAd) и модифицированного вируса осповакцины Анкара (MVA). При введении свиньям рекомбинантного вируса rAd в дозе $1{,}5\times10^{10}$ МЕ и рекомбинантного вируса MVA в дозе 2×10^8 БОЕ и повторного заражения вирулентным изолятом АЧС OURT88/1 наблюдалась виремия в течение 6 сут, при этом ни оно животное не погибло (83).

Важным этапом в развитии молекулярной биологии стала технология CRISPR/Cas9, которая уже экспериментально показала результаты в экспрессии белка vp30, кодируемого геном *CP204L* вируса АЧС (84). В системе CRISPR/Cas9 был синтезирован рекомбинантный вариант высоковирулентного изолята ASFV-Kenya-IX-1033 (генотип IX) с делецией гена *A238L* (85). Этот метод рассматривают как самый перспективным для редактирования генома вирусов, в том числе возбудителя АЧС.

Доступная обобщенная информация о генно-инженерных вакцинах против АЧС представлена в таблице 3. Из данных этой таблицы видно, что

использование рекомбинации различных генов, экспрессируемых с помощью плазмидных и вирусных векторов, — один из наиболее интересных и перспективных подходов при разработке вакцины против АЧС. Различные гены можно объединять в пулы для достижения наилучшего результата, который варьируется от полного отсутствия защиты до 100 % протекции (см. табл. 3). Успех таких результатов зависит как от комбинации используемых генов, так и от их влияния друг на друга.

3. Данные об использовании рекомбинантных конструкций в качестве перспективных вакцин против африканской чумы свиней

Белки вируса АЧС	Система экспрессии, вектор	Степень защиты	Ссылка
Убиквитин-CD2v, vp54 и vp30	Плазмида pCMV-UbsHAPQ	Частичная защита (33 %)	(78)
vp54, vp30, sHA	Плазмида BacMam-sHAPQ	Частичная защита	(77)
7 антигенов: vpA151R, vpB119L, vpB602L, vpEP402RΔPRR, vpB438L, vpK205R и vpA104R	Аденовирус человека 5	Биопроба не проводилась	(80)
47 антигенов	Плазмида pCMVi-LS и модифицированный вирус осповакцины	Нет защиты	(81)
CD2v, vp32, vp72, vp17	Плазмида *Escherichia coli* pGEX 4T-1	Нет защиты	(82)
vp15, vp35, vp54 и vp17	Плазмида *Escherichia coli* pGEX 4T-1	Нет защиты	(82)
35 антигенов	Аденовирус человека 5	Нет защиты	(79)
8 антигенов: vpB602L, vpB646L, vpE183L, vpE199L, vpCP204L, vpF317L, vpEP153R, vpMGF505-5R	Аденовирус человека 5	Полная защита (100 %)	(83)
8 антигенов: vpB602L, vpB646L, vpE183L, vpE199L, vpCP204L, vpF317L, vpEP153R, vpMGF505-5R	Модифицированный вирус осповакцины Анкара (MVA)	Полная защита (100 %)	(83)

Таким образом, можно заключить, что, несмотря на значительный накопленный опыт изучения генома вируса АЧС, а также функциональных и иммунологических характеристик вирусных белков, на сегодняшний день в мире не существует ни одной сертифицированной вакцины против АЧС. После относительно длительного затишья новая эпизоотия АЧС в 2007-2021 годах привела к многомиллиардным убыткам во всех секторах свиноводства и охоты. В КНР потери от АЧС в 2018-2019 году составили 0,78 % ВВП страны (86). В связи с этим вновь остро стал вопрос о необходимости эффективной защиты хозяйств от АЧС не только методами общей профилактики, но и с помощью вакцинации. Для независимой оценки препаратов специфической профилактики АЧС требуются дальнейшие исследования возможных вакцин-кандидатов в товарном свиноводстве разных стран, чтобы избежать хронического течения АЧС, персистирующей в конкретно взятом государстве (87). Для осуществления стратегии по дифференциации инфицированных животных от вакцинированных (DIVA) предлагается применять вакцинный вариант вируса АЧС с индуцированной делецией консервативного гена *E184L* иммуногенного белка, что позволяет четко определить отсутствие антител к этому белку у вакцинированных особей (88).

Итак, разработка эффективных и безопасных вакцин против африканской чумы свиней (АЧС) продолжается почти 90 лет. Широкое применение в середине XX века аттенуированных вакцин против гомологичных изолятов вируса АЧС во многих странах Европы (Испании, Португалии) привело к масштабной циркуляции патогенного вируса в популяции домашних и диких свиней и к росту численности поголовья с хроническим течением болезни. Попытка ослабления вирулентных свойств вируса методом последовательных пассажей на многих первичных и перевиваемых линиях культур клеток с целью создания вакцины не увенчалась успехом.

Инактивированные, а также субъединичные вакцины на основе рекомбинантных белков обладали высокой иммуногенностью, однако протективных свойств не имели независимо от того, какие адъюванты и инактиванты использовались. Применение технологии гомологичной рекомбинации для получения клонов вируса АЧС с делецией определенных генов привело к созданию успешных вакцин-кандидатов. Человеческий аденовирус 5 (rAd) и модифицированный вирус осповакцины Анкара (MVA) зарекомендовали себя в качестве векторных конструкций для переноса ДНК вируса АЧС при разработке эффективных рекомбинантных (векторных) вакцин. Самыми перспективными, с нашей точки зрения, представляются экспериментальные вакцины на основе генетически модифицированных вирусов ASFV-G-ΔI177L и SY18ΔI226R, демонстрирующие 100 % защиты свиней, как минимум, от гомологичных изолятов генотипа II вируса АЧС. Подобные ожидания порождает и кандидатная вакцина на основе HLJ/18-7GD.

ФБГУ Федеральный центр охраны здоровья животных,
600901 Россия, г. Владимир, мкр. Юрьевец, ФГБУ ВНИИЗЖ,
e-mail: chernishev_rs@arriah.ru, sprygin@arriah.ru, igolkin_as@arriah.ru,
zhbanova@arriah.ru, perevozchikova@arriah.ru, romenskaya@arriah.ru,
gruzdev@arriah.ru, mazlum@arriah.ru ✉

Поступила в редакцию
28 марта 2022 года

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [*Agricultural Biology*], 2022, V. 57, № 4, pp. 609-627

CURRENT APPROACHES TO THE VACCINE DEVELOPMENT FOR AFRICAN SWINE FEVER
(review)

R.S. Chernyshev, A.V. Sprygin, A.S. Igolkin, T.V. Zhbanova, N.A. Perevozchikova, D.V. Romenskaya, K.N. Gruzdev, A. Mazloum✉

Federal Centre for Animal Health, Yuryevets microdistrict, Vladimir Province, Vladimir, 600901 Russia, e-mail chernishev_rs@arriah.ru, sprygin@arriah.ru, igolkin_as@arriah.ru, zhbanova@arriah.ru, perevozchikova@arriah.ru, romenskaya@arriah.ru, gruzdev@arriah.ru, mazlum@arriah.ru (✉ corresponding author)
ORCID:
Chernyshev R.S. orcid.org/0000-0003-3604-7161
Sprygin A.V. orcid.org/0000-0001-5982-3675
Igolkin A.S. orcid.org/0000-0002-5438-8026
Zhbanova T.V. orcid.org/0000-0002-9857-5915
Perevozchikova N.A. orcid.org/0000-0002-5217-3259
Romenskaya D.V. orcid.org/0000-0002-2443-1898
Gruzdev K.N. orcid.org/0000-0003-3159-1969
Mazloum Ali orcid.org/0000-0002-5982-8393
The authors declare no conflict of interests
Acknowledgements:
Supported financially by the grant No. 075-15-2021-1054 from the Ministry of Education and Science of Russia to implement objectives of the Federal Scientific and Technical Program for the Development of genetic technologies during 2019-2027
Received March 28, 2022
doi: 10.15389/agrobiology.2022.4.609eng

Abstract

African swine fever (ASF), first described in 1921 by R.E. Montgomery (R.E. Montgomery, 1921), has been a major problem in pig production for over 100 years. The search for effective and universal specific vaccine variants started back in 1933 (J. Walker, 1933). This article presents a literature review on the most important and successful events in the history of ASF vaccine development, presenting the approaches on developing attenuated (C. Mucoz-Pérez et al, 2021), inactivated (E. Cadenas-Fernández et al., 2021), subunit (J.G. Neilan et al., 2004) and live vectored (J.K. Jancovich et al., 2018) vaccines. The widespread use of naturally attenuated non-hemadsorbing isolates as vaccines in the second half of the 20th century in European countries led to a persistent chronic ASF infection in a big number of pigs (J. Manso Ribeiro et al., 1963). Successive passages of field isolates of the ASF virus in many cell cultures did not show the proper result in weakening the virulent properties of the pathogen, despite genetic changes in the virus genome (I. Titov et al., 2017). Only modern technologies (e.g., homologous recombination and CRISPR-Cas9 genome editing) for obtaining genetically modified virus ASFV-G-ΔI177L by deleting specific genes in the genome led to the creation of effective candidate vaccines (M.V. Borca et al., 2020). Inactivated, as well as subunit vaccines based on recombinant proteins, caused the formation of specific humoral immune responses in high titers, but did not confer protective properties (G. Burmakina et al., 2016). Live vectored vaccines have become a new milestone in the fight against infectious animal diseases, in particular ASF; human adenovirus 5 (rAd)

and modified vaccinia Ankara (MVA) are among the vectors for the development of such vaccines (L.C. Goatley et al., 2020). Attenuated vaccines based on genetically modified viruses with a deletion of specific genes *I226R* and *18-7GD* require international expertise for further registration and use in veterinary practice.

Keywords: African swine fever, ASF, vaccines, inactivated vaccine, attenuated vaccine, DNA-vaccine, recombinant vaccine, CRISPR-Cas9.

REFERENCES

1. Urbano A.C., Forth J.H., Olesen A., Dixon L., Rasmussen T., Cackett G., Werner F., Karger A., Andrés G., Wang X., Pérez-Núcez D., Galindo I., Malogolovkin A., Revilla Y., Alonso C., Gallardo C., Blome S., Arabyan E., Zakaryan H., Ferreira F. African swine fever virus: cellular and molecular aspects. In: *Understanding and combatting African swine fever. A European perspective*. L. Iacolina, M.-L. Penrith, S. Bellini, E. Chenais, F. Jori, M. Montoya, K. Stehl, D. Gavier-Widén (eds.). Wageningen Academic Publishers, 2021: 25-61 (doi: 10.3920/978-90-8686-910-7_2).
2. Dixon L.K., Chapman D.A.G., Netherton C.L., Upton C. African swine fever virus replication and genomics. *Virus Research*, 2013, 173(1): 3-14 (doi: 10.1016/j.virusres.2012.10.020).
3. Balyshev V.M., Bolgova M.V., Balysheva V.I., Bolgova M.V., Knyazeva M.V. *Voprosy normativno-pravovogo regulirovaniya v veterinarii*, 2015, 2: 23-25 (in Russ.).
4. Quembo C.J., Jori F., Vosloo W., Heath L. Genetic characterization of African swine fever virus isolates from soft ticks at the wildlife/domestic interface in Mozambique and identification of a novel genotype. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2018, 665(2): 420-431 (doi: 10.1111/tbed.12700).
5. Nix R.J., Gallardo C., Hutchings G., Blanco E., Dixon L.K. Molecular epidemiology of African swine fever virus studied by analysis of four variable genome regions. *Archives of Virology*, 2006, 151(12): 2475-2494 (doi: 10.1007/s00705-006-0794-z).
6. Mazloum A., Igolkin A.S., Vlasova N.N. African swine fever virus: use genetic markers in analysis of its routes of spread. *Veterinary Science Today*, 2019, 30: 9-14 (doi: 10.29326/2304-196X-2019-3-30-3-8).
7. Beltrán-Alcrudo D., Lubroth J., Depner K., Rocque S. African swine fever in the Caucasus. *EMPRES Watch*, 2008, 1: 1-8 (doi: 10.13140/RG.2.1.3579.1200).
8. Rossel'khoznadzor. Federal'naya sluzhba po veterinarnomu i fitosanitarnomu nadzoru. *Epizooticheskaya situatsiya po AChS na territorii Rossiyskoy Federatsii v 2007 g* [Epizootic situation on ASF in the territory of the Russian Federation in 2007]. Available: https://fsvps.gov.ru/fsvps-docs/ru/iac/asf/archive/asf_2007.pdf. Accessed: 16.01.2022 (in Russ.).
9. Rossel'khoznadzor. Federal'naya sluzhba po veterinarnomu i fitosanitarnomu nadzoru. *Epizooticheskaya situatsiya po AChS na territorii Rossiyskoy Federatsii i stran Vostochnoy Evropy. Dannye MEB s 2007 po 2020 gg* [Epizootic situation on ASF in the territory of the Russian Federation and Eastern European countries. OIE data from 2007 to 2020]. Available: https://fsvps.gov.ru/fsvps-docs/ru/iac/asf/2020/09-14/05.pdf. Accessed: 16.01.2022 (in Russ.).
10. Rossel'khoznadzor. Federal'naya sluzhba po veterinarnomu i fitosanitarnomu nadzoru. *Epizooticheskaya situatsiya po AChS na territorii Rossiyskoy Federatsii i stranakh Evropy i Azii. Dannye MEB s 2007 po 2021 gg* [The epizootic situation on ASF in the territory of the Russian Federation and the countries of Europe and Asia. OIE data from 2007 to 2021]. Available: https://fsvps.gov.ru/fsvps-docs/ru/iac/asf/2022/01-18/04.pdf. Accessed: 18.01.2022 (in Russ.).
11. OIE — World Organization for Animal Health. *Analytics: Quantitative data*. Available: https://wahis.oie.int/#/dashboards/qd-dashboard. Accessed: 18.12.2021.
12. OIE — World Organization for Animal Health. *African swine fever (ASF) — Situation report. Report Date: 03.12.2021*. Available: https://www.oie.int/app/uploads/2021/12/report-65-current-situation-of-asf.pdf. Accessed: 18.12.2021.
13. Beltrán-Alcrudo D., Arias M., Gallardo C., Kramer S., Penrith M.L. *African swine fever: detection and diagnosis — a manual for veterinarians*. FAO, 2017.
14. Wilkinson P.J., Pegram R.G., Perry B.D., Lemche J., Schels H.F. The distribution of African swine fever virus isolated from *Ornithodoros moubata* in Zambia. *Epidemiology and Infection*, 1988, 101(3): 547-564 (doi: 10.1017/s0950268800029423).
15. Makarov V.V., Sukharev O.I., Tsvetnova I.V. *Veterinarnaya praktika*, 2013, 1: 6-16 (in Russ.).
16. Makarov V.V. *Afrikanskaya chuma sviney* [African swine fever]. Moscow, 2011 (in Russ.).
17. Escribano J.M., Galindo I., Alonso C. Antibody-mediated neutralization of African swine fever virus: myths and facts. *Virus Research*, 2013, 173(1): 101-109 (doi: 10.1016/j.virusres.2012.10.012).
18. Gaudreault N., Richt J. Subunit vaccine approaches for African swine fever virus. *Vaccines*, 2019, 7(2): 56 (doi: 10.3390/vaccines7020056).
19. Halstead S.B., Mahalingam S., Marovich M.A., Ubol S., Mosser D.M. Intrinsic antibody-dependent enhancement of microbial infection in macrophages: disease regulation by immune complexes. *The Lancet Infectious Diseases*, 2010, 10(10): 712-722 (doi: 10.1016/S1473-3099(10)70166-3).
20. Suhrbier A., La Linn M. Suppression of antiviral responses by antibody-dependent enhancement

of macrophage infection. *Trends in Immunology*, 2003, 24(4): 165-168 (doi: 10.1016/s1471-4906(03)00065-6).
21. Netherton C.L., Goatley L.C., Reis A.L., Portugal R., Nash R.H., Morgan S.B., Gault L., Nieto R., Norlin V., Gallardo C., Ho C.S., Sánchez-Cordón P.J., Taylor G., Dixon L.K. Identification and immunogenicity of african swine fever virus antigens. *Front. Immunol.*, 2019, 10: 1318 (doi: 10.3389/fimmu.2019.01318).
22. Mucoz-Pérez C., Jurado C., Sánchez-Vizcaíno J. African swine fever vaccine: turning a dream into reality. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2021. 68(5): 2657-2668 (doi: 10.1111/tbed.14191).
23. Mendonza C., Videgain S.P., Alonso F. Inhibition of natural killer activity in porcine mononuclear cells by African swine fever virus. *Research in Veterinary Science*, 1991, 51(3): 317-321 (doi: 10.1016/0034-5288(91)90084-2).
24. Martins C., Lawman M., Schol T., Mebus C., Lunney J. African swine fever virus specific porcine cytotoxic T cell activity. *Archives of Virology*, 1993, 129(1-4): 211-225 (doi: 10.1007/BF01316896).
25. Ribeiro A.S., Arala-Chaves M.P., Vilanova M., Porto M.T., Coutinho A. Role of B and T lymphocytes in the specific immunosuppression induced by a protein released by porcine monocytes infected with African swine fever virus. *International Immunology*, 1991, 3(2): 165-74 (doi: 10.1093/intimm/3.2.165).
26. Vilanova M., Ferreira P., Ribeiro A., Arala-Chaves M. 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*, 1999, 96(3): 389-395 (doi: 10.1046/j.1365-2567.1999.00629.x).
27. Pershin A., Shevchenko I., Igolkin A., Zhukov I., Mazloum A., Aronova E., Vlasova N., Shevtsov A. A long-term study of the biological properties of ASF virus isolates originating from various regions of the Russian Federation in 2013-2018. *Veterinary Sciences*, 2019, 6(4): 99 (doi: 10.3390/vetsci6040099).
28. Zsak L., Onisk D.V., Afonso C.L., Rock D.L. Virulent African swine fever virus isolates are neutralized by swine immune serum and by monoclonal antibodies recognizing a 72-kDa viral protein. *Virology*, 1993, 196(2): 596-602 (doi: 10.1006/viro.1993.1515).
29. Onisk D.V., Borca M.V., Kutish G., Kramer E., Irusta P., Rock D.L. Passively transferred African swine fever virus antibodies protect swine against lethal infection. *Virology*, 1994, 198(1): 350-354 (doi: 10.1006/viro.1994.1040).
30. Gómez-Puertas P., Rodríguez F., Oviedo J.M., Ramiro-Ibáñez F., Ruiz-Gonzalvo F., Alonso C., Escribano J.M. Neutralizing antibodies to different proteins of African swine fever virus inhibit both virus attachment and internalization. *Journal of Virology*, 1996, 70(8): 5689-5694 (doi: 10.1128/JVI.70.8.5689-5694.1996).
31. Alonso C., Miskin J., Hernáez B., Fernandez-Zapatero P., Soto L., Cantó C., Rodríguez-Crespo I., Dixon L., Escribano J.M. African swine fever virus protein p54 interacts with the microtubular motor complex through direct binding to light-chain dynein. *Journal of Virology*, 2001, 75(20): 9819-9827 (doi: 10.1128/JVI.75.20.9819-9827.2001).
32. Hernáez B., Tarragó T., Giralt E., Escribano J.M., Alonso C. Small peptide inhibitors disrupt a high-affinity interaction between cytoplasmic dynein and a viral cargo protein. *Journal of Virology*, 2010, 84(20): 10792-10801 (doi: 10.1128/JVI.01168-10).
33. Walker J. East African swine fever. University of Zürich, 1933.
34. Stone S.S., DeLay P.D., Sharman E.C. The antibody response in pigs inoculated with attenuated African swine fever virus. *Can. J. Comp. Med.*, 1968, 32(3): 455-460.
35. Hamdy F.M., Dardiri A.H. Clinical and immunologic responses of pigs to African swine fever virus isolated from the Western Hemisphere. *American Journal of Veterinary Research*, 1984, 45(4): 711-804.
36. Boinas F., Hutchings G., Dixon L., Wilkinson P. Characterization of pathogenic and non-pathogenic African swine fever virus isolates from *Ornithodoros erraticus* inhabiting pig premises in Portugal. *J. Gen. Virol.*, 2004, 85: 2177-2187 (doi: 10.1099/vir.0.80058-0).
37. Leitão A., Cartaxeiro C., Coelho R., Cruz B., Parkhouse R., Portugal F.C., Vigário J.D., Martins C.L.V. 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.*, 2001, 82(3): 513-523 (doi: 10.1099/0022-1317-82-3-513).
38. Vigário J.D., Terrinha A.M., Moura Nunes J.F. Antigenic relationships among strains of African swine fever virus. *Archiv für die gesamte Virusforschung*, 1974, 45(3): 272-277 (doi: 10.1007/BF01249690).
39. King K., Chapman D., Argilaguet J.M., Fishbourne E., Hutet E., Cariolet R., Hutchings G., Oura C.A., Netherton C.L., Moffat K., Taylor G., Le Potier M.F., Dixon L.K., Takamatsu H.H. Protection of European domestic pigs from virulent African isolates of African swine fever virus by experimental immunisation. *Vaccine*, 2011, 29(28): 4593-4600 (doi: 10.1016/j.vaccine.2011.04.052).
40. Gallardo C., Soler A., Rodze I., Nieto R., Cano-Gómez C., Fernandez-Pinero J., Arias M. Attenuated and non-haemadsorbing (non-HAD) genotype II African swine fever virus (ASFV) isolated in Europe, Latvia 2017. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2019, 66(3): 1399-1404 (doi: 10.1111/tbed.13132).

41. Barasona J.A., Gallardo C., Cadenas-Fernández E., Jurado C., Rivera B., Rodríguez-Bertos A., Arias M., Sánchez-Vizcaíno J.M. First oral vaccination of Eurasian wild boar against African swine fever virus genotype II. *Frontiers in Veterinary Science*, 2019, 6: 137 (doi: 10.3389/fvets.2019.00137).
42. Barasona J.A., Cadenas-Fernández E., Kosowska A., Barroso-Arévalo S., Rivera B., Sánchez R., Porras N., Gallardo C., Sánchez-Vizcaíno J.M. Safety of African swine fever vaccine candidate Lv17/WB/Rie1 in wild boar: overdose and repeated doses. *Frontiers in Immunology*, 2021, 12: 761753 (doi: 10.3389/fimmu.2021.761753).
43. Enjuanes L., Carrascosa A.L., Moreno M.A., Vicuela E. Titration of African swine fever (ASF) virus. *J. Gen. Virol.*, 1976, 32(3): 471-477 (doi: 10.1099/0022-1317-32-3-471).
44. Titov I., Burmakina G., Morgunov Y., Morgunov S., Koltsov A., Malogolovkin A., Kolbasov D. Virulent strain of African swine fever virus eclipses its attenuated derivative after challenge. *Archives of Virology*, 2017, 162(10): 3081-3088 (doi: 10.1007/s00705-017-3471-5).
45. Elsukova A.A., Shevchenko I.V., Varentsova A., Puzankova O.S., Zhukov I.Y., Pershin A.S., Remyga S.G., Zinyakov N.G., Mazloum A., Vlasov I.N., Igolkin A.S., Lozovoy D.A., Gruzdev K.N., Vlasova N.N. Biological properties of African swine fever virus Odintsovo 02/14 isolate and its genome analysis. *International Journal of Environmental and Agriculture Research*, 2017, 3: 26-37 (doi: 10.25125/agriculture-journal-IJOEAR-OCT-2017-15).
46. Mazloum A., Zinyakov N.G., Pershin A.S., Shevchenko I.V., Zhukov I.Y., Fedoseyeva D.N., Sharypova D.V., Igolkin A.S., Vlasova N.N. Analysis of changes in African swine fever virus genetic structure and biological properties during adaptation to continuous cell culture. *Veterinary Science Today*, 2018, 27: 21-25 (doi: 10.29326/2304-196X-2018-4-27-21-25).
47. Dixon L.K., Chapman D.A., Netherton C.L., Upton C. African swine fever virus replication and genomics. *Virus Research*, 2013, 173(1): 3-14 (doi: 10.1016/j.virusres.2012.10.020).
48. Mazloum A., Igolkin A.S., Zinyakov N.G., Van Schalkwyk A., Vlasova N.N. Changes in the genome of African swine fever virus (*Asfarviridae*: *Asfivirus*: African swine fever virus) associated with adaptation to reproduction in continuous cell culture. *Voprosy virusologii*, 2021, 66(3): 211-216 (doi: 10.36233/0507-4088-50).
49. Krug P.W., Holinka L.G., O'Donnell V., Reese B., Sanford B., Fernandez-Sainz I., Gladue D.P., Arzt J., Rodriguez L., Risatti G.R., Borca M.V. The progressive adaptation of a Georgian isolate of African swine fever virus to Vero cells leads to a gradual attenuation of virulence in swine corresponding to major modifications of the viral genome. *Journal of Virology*, 2015, 89(4): 2324-2332 (doi: 10.1128/JVI.03250-14).
50. O'Donnell V., Risatti G.R., Holinka L.G., Krug P.W., Carlson J., Velazquez-Salinas L., Azzinaro P.A., Gladue D.P., Borca M.V. 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. *Journal of Virology*, 2016, 91(1): e01760-16 (doi: 10.1128/JVI.01760-16).
51. Moore D.M., Zsak L., Neilan J.G., Lu Z., Rock D.L. The African swine fever virus thymidine kinase gene is required for efficient replication in swine macrophages and for virulence in swine. *Journal of Virology*, 1998, 72(12): 10310-10315 (doi: 10.1128/JVI.72.12.10310-10315.1998).
52. Sanford B., Holinka L., O'Donnell V., Krug P., Carlson J., Alfano M., Carrillo C., Wu P., Lowe A., Risatti G., Gladue D., Borca M. Deletion of the thymidine kinase gene induces complete attenuation of the Georgia isolate of African swine fever virus. *Virus Research*, 2016, 213: 165-171 (doi: 10.1016/j.virusres.2015.12.002).
53. O'Donnell V., Holinka L.G., Gladue D.P., Sanford B., Krug P.W., Lu X., Arzt J., Reese B., Carrillo C., Risatti G.R., Borca M.V. 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. *Journal of Virology*, 2015, 89(11): 6048-6056 (doi: 10.1128/JVI.00554-15).
54. Lewis T., Zsak L., Burrage T.G., Lu Z., Kutish G.F., Neilan J.G., Rock D.L. An African swine fever virus ERV1-ALR homologue, *9GL*, affects virion maturation and viral growth in macrophages and viral virulence in swine. *Journal of Virology*, 2000, 74(3): 1275-1285 (doi: 10.1128/jvi.74.3.1275-1285.2000).
55. Wu L., Yang B., Yuan X., Hong J., Peng M., Chen J.L., Song Z. Regulation and evasion of host immune response by African swine fever virus. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 698001 (doi: 10.3389/fmicb.2021.698001).
56. Monteagudo P.L., Lacasta A., López E., Bosch L., Collado J., Pina-Pedrero S., Correa-Fiz F., Accensi F., Navas M.J., Vidal E., Bustos M.J., Rodríguez J.M., Gallei A., Nikolin V., Salas M.L., Rodríguez F. BA71ΔCD2: a new recombinant live attenuated African swine fever virus with cross-protective capabilities. *Journal of Virology*, 2017, 91(21): e01058-17 (doi: 10.1128/JVI.01058-17).
57. Lopez E., van Heerden J., Bosch-Camós L., Accensi F., Navas M.J., López-Monteagudo P., Argilaguet J., Gallardo C., Pina-Pedrero S., Salas M.L., Salt J., Rodriguez F. Live attenuated African swine fever viruses as ideal tools to dissect the mechanisms involved in cross-protection. *Viruses*, 2020, 12(12): 1474 (doi: 10.3390/v12121474).
58. Reis A.L., Goatley L.C., Jabbar T., Sanchez-Cordon P.J., Netherton C.L., Chapman D.A.G., Dixon L.K. 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. *Journal of Virology*, 2017, 91(24): e01428-17 (doi: 10.1128/JVI.01428-17).
59. Gallardo C., Sánchez E.G., Pérez-Núcez D., Nogal M., de León P., Carrascosa Á.L., Nieto R., Soler A., Arias M.L., Revilla Y. African swine fever virus (ASFV) protection mediated by NH/P68 and NH/P68 recombinant live-attenuated viruses. *Vaccine*, 2018, 36(19): 2694-2704 (doi: 10.1016/j.vaccine.2018.03.040).
60. Chen W., Zhao D., He X., Liu R., Wang Z., Zhang X., Li F., Shan D., Chen H., Zhang J., Wang L., Wen Z., Wang X., Guan Y., Liu J., Bu Z. A seven-gene-deleted African swine fever virus is safe and effective as a live attenuated vaccine in pigs. *Sci. China Life Sci*,, 2020, 63(5): 623-634 (doi: 10.1007/s11427-020-1657-9).
61. Borca M.V., Ramirez-Medina E., Silva E., Vuono E., Rai A., Pruitt S., Holinka L.G., Velazquez-Salinas L., Zhu J., Gladue D.P. Development of a highly effective African swine fever virus vaccine by deletion of the *I177L* gene results in sterile immunity against the current epidemic Eurasia strain. *Journal of Virology*, 2020, 94: e02017-19 (doi: 10.1128/JVI.02017-19).
62. Borca M.V., Rai A., Ramirez-Medina E., Silva E., Velazquez-Salinas L., Vuono E., Pruitt S., Espinoza N., Gladue D.P. A cell culture-adapted vaccine virus against the current African swine fever virus pandemic strain. *Journal of Virology*, 2021, 95(14): e0012321 (doi: 10.1128/JVI.00123-21).
63. Borca M.V., Ramirez-Medina E., Silva E., Vuono E., Rai A., Pruitt S., Espinoza N., Velazquez-Salinas L., Gay C.G., Gladue D.P. ASFV-G-ΔI177L as an effective oral nasal vaccine against the Eurasia strain of Africa swine fever. *Viruses*, 2021, 13(5): 765 (doi: 10.3390/v13050765).
64. Tran X.H., Le T.T.P., Nguyen Q.H., Do T.T., Nguyen V.D., Gay C.G., Borca M.V., Gladue D.P. African swine fever virus vaccine candidate ASFV-G-ΔI177L efficiently protects European and native pig breeds against circulating Vietnamese field strain. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2021, 69: e497-e504 (doi: 10.1111/tbed.14329).
65. Zhang Y., Ke J., Zhang J., Yang J., Yue H., Zhou X., Qi Y., Zhu R., Miao F., Li Q., Zhang F., Wang Y., Han X., Mi L., Yang J., Zhang S., Chen T., Hu R. African swine fever virus bearing an *I226R* gene deletion elicits robust immunity in pigs to African swine fever. *Journal of Virology*, 2021, 95(23): e0119921 (doi: 10.1128/JVI.01199-21).
66. Stone S.S., Hess W.R. Antibody response to inactivated preparations of African swine fever virus in pigs. *American Journal of Veterinary Research*, 1967, 28(123): 475-481.
67. Forman A.J., Wardley R.C., Wilkinson P.J. The immunological response of pigs and Guinea pigs to antigens of African swine fever virus. *Archives of Virology*, 1982, 74(2-3): 91-100 (doi: 10.1007/BF01314703).
68. Bommeli W., Kihm U., Ehrensperger F. Preliminary study on immunization of pigs against African swine fever In: *Proceedings of a CEC/FAO Research Seminar, Sassari, Sardinia, Italy, 23-25 September 1981*. Sassari, 1981: 217-223.
69. Cadenas-Fernández E., Sánchez-Vizcaíno J.M., van den Born E., Kosowska A., van Kilsdonk E., Fernández-Pacheco P., Gallardo C., Arias M., Barasona J.A. High doses of inactivated African Swine fever virus are safe, but do not confer protection against a virulent challenge. *Vaccines*, 2021, 9(3): 242 (doi: 10.3390/vaccines9030242).
70. 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).
71. 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(1): 285-289 (doi: 10.1006/viro.1996.0193).
72. Carrascosa A.L., Sastre I., Vicuela E. Production and purification of recombinant African swine fever virus attachment protein p12. *Journal of Biotechnology*, 1995, 40(2): 73-86 (doi: 10.1016/0168-1656(95)00035-o).
73. 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(2): 461-471 (doi: 10.1006/viro.1998.9068).
74. Barderas M.G., Rodríguez F., Gómez-Puertas P., Avilés M., Beitia F., Alonso C., Escribano J.M. Antigenic and immunogenic properties of a chimera of two immunodominant African swine fever virus proteins. *Archives of Virology*, 2001, 146(9): 1681-1691 (doi: 10.1007/s007050170056).
75. Burmakina G., Malogolovkin A., Tulman E.R., Zsak L., Delhon G., Diel D.G., Shobogorov N.M., Morgunov Y.P., Morgunov S.Y., Kutish G.F., Kolbasov D., Rock D.L. African swine fever virus serotype-specific proteins are significant protective antigens for African swine fever. *J. Gen. Virol.*, 2016, 97(7): 1670-1675 (doi: 10.1099/jgv.0.000490).
76. 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(2): 337-342 (doi: 10.1016/j.virol.2003.11.011).
77. Argilaguet 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).

78. Argilaguet 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. 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).
79. Cadenas-Fernández E., Sánchez-Vizcaíno J.M., Kosowska A., Rivera B., Mayoral-Alegre F., Rodríguez-Bertos A., Yao J., Bray J., Lokhandwala S., Mwangi W., Barasona J.A. Adenovirus-vectored African swine fever virus antigens cocktail is not protective against virulent arm07 isolate in Eurasian wild boar. *Pathogens*, 2020, 9(3): 171 (doi: 10.3390/pathogens9030171).
80. Lokhandwala S., Waghela S.D., Bray J., Sangewar N., Charendoff C., Martin C.L., Hassan W.S., Koynarski T., Gabbert L., Burrage T.G., Brake D., Neilan J., Mwangi W. Adenovirus-vectored novel African swine fever virus antigens elicit robust immune responses in swine. *PLoS ONE*, 2017, 12(5): e0177007 (doi: 10.1371/journal.pone.0177007).
81. 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. *Journal of Virology*, 2018, 92(8): e02219-17 (doi: 10.1128/JVI.02219-17).
82. Sunwoo S.Y., Pérez-Núñez D., Morozov I., Sánchez E.G., Gaudreault N.N., Trujillo J.D., Mur L., Nogal M., Madden D., Urbaniak K., Kim I.J., Ma W., Revilla Y., Richt J.A. DNA-protein vaccination strategy does not protect from challenge with African swine fever virus Armenia 2007 strain. *Vaccines*, 2019, 7(1): 12 (doi: 10.3390/vaccines7010012).
83. Goatley L.C., Reis A.L., Portugal R., Goldswain H., Shimmon G.L., Hargreaves Z., Ho C.S., Montoya M., Sánchez-Cordón P.J., Taylor G., Dixon L.K., Netherton C.L. A pool of eight virally vectored African swine fever antigens protect pigs against fatal disease. *Vaccines*, 2020, 8(2): 234 (doi: 10.3390/vaccines8020234).
84. Hübner A., Petersen B., Keil G.M., Niemann H., Mettenleiter T.C., Fuchs W. Efficient inhibition of African swine fever virus replication by CRISPR/Cas9 targeting of the viral p30 gene (*CP204L*). *Sci. Rep.*, 2018, 8(1): 1449 (doi: 10.1038/s41598-018-19626-1).
85. Abkallo H.M., Svitek N., Oduor B., Awino E., Henson S.P., Oyola S.O., Mwalimu S., Assad-Garcia N., Fuchs W., Vashee S., Steinaa L. Rapid CRISPR/Cas9 editing of genotype IX African swine fever virus circulating in Eastern and Central Africa. *Frontiers in Genetics*, 2021, 12: 733674 (doi: 10.3389/fgene.2021.733674).
86. You S., Liu T., Zhang M., Zhao X., Dong Y., Wu B., Wang Y., Li J., Wei X., Shi B. African swine fever outbreaks in China led to gross domestic product and economic losses. *Nature Food*, 2021, 2: 802-808 (doi: 10.1038/s43016-021-00362-1).
87. Manso Ribeiro J., Nines Petisca J.L., Lopes Frizão F., Sobral M. Vaccination contre la peste porcine africaine. *Bulletin de l'Office International des Epizooties*, 1963, 80: 921-937.
88. Ramirez-Medina E., Vuono E., Rai A., Pruitt S., Espinoza N., Velazquez-Salinas L., Pina-Pedrero S., Zhu J., Rodriguez F., Borca M.V., Gladue D.P. Deletion of *E184L*, a putative DIVA target from the pandemic strain of African Swine fever virus, produces a reduction in virulence and protection against virulent challenge. *Journal of Virology*, 2022, 96(1): e0141921 (doi: 10.1128/JVI.01419-21).