

Обзоры, проблемы

УДК 636.4:619:616.98:578:612.017.11/.12

doi: 10.15389/agrobiology.2015.6.709rus

ГУМОРАЛЬНЫЕ И КЛЕТОЧНО-ОПОСРЕДОВАННЫЕ МЕХАНИЗМЫ ИММУНИТЕТА ПРИ АФРИКАНСКОЙ ЧУМЕ СВИНЕЙ

(обзор)

А.Д. СЕРЕДА, А.С. КАЗАКОВА, А.Р. ИМАТДИНОВ, Д.В. КОЛБАСОВ

О формировании защитного иммунитета при африканской чуме свиней (АЧС) свидетельствует бессимптомное течение инфекции в аборигенных популяциях *Phacochoerus africanus*, *Potamochoerus porcus*, *Hylochoerus* spp. в Африке и лабораторное получение авирулентных штаммов вируса АЧС (African swine fever virus — ASFV), инокуляция которых свиньям защищает их от гибели в случае последующего заражения гомологичным вирулентным изолятом. Перенос сыворотки или молозива от конвалесцентов интактным свиньям в случае их последующего заражения вирулентным изолятом может задержать проявление клинических симптомов болезни, уменьшить виремиею и увеличить процент выживших особей (R.C. Knudsen с соавт., 1987; D.H. Schlafer с соавт., 1984; D.V. Onisk с соавт., 1994). Вероятнее всего, гуморальное звено иммунитета реализуется не за счет нейтрализации вируса АЧС, а с участием механизмов комплементзависимого цитолиза (КЗЦ) и антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ) (В.В. Макаров, 2013). Включение клеточно-опосредованных механизмов защиты, лизис зараженных клеток нормальными киллерами (N-киллерами) и цитотоксическими Т-лимфоцитами (ЦТЛ) обеспечивает хроническое или бессимптомное течение инфекции (S.G. Norley с соавт., 1983, 1984). Установлено, что истощение моноклональными антителами *in vivo* CD8⁺ Т-лимфоцитов свиней, предварительно иммунизированных аттенуированным штаммом вируса АЧС, аннулирует защитный иммунитет к их последующему заражению вирулентным гомологичным штаммом (С.А.Л. Ouga с соавт., 2005). Индукция и эффекторная активность АЗКЦ и ЦТЛ зависят от дозы и биологических свойств штаммов вируса АЧС (А.Д. Середина, 2010). Высокая АЗКЦ, начиная с 3-х сут, и активность клеточно-опосредованных механизмов иммунитета на 6-е сут после инокуляции вируса АЧС обеспечивают быстрое снижение титров вируса в крови и, соответственно, отсутствие клинических симптомов болезни (А.Д. Середина с соавт., 1992). Гуморальные и клеточно-опосредованные механизмы защиты действуют синергично, что принципиально важно учитывать при создании кандидатных рекомбинантных вакцин против АЧС. Определены белки вируса АЧС, которые считаются вероятными кандидатами на роль антигенов, индуцирующих формирование протективных механизмов при АЧС. Иммунизация свиней комбинацией вирусных белков р54 и р30-32 приводила к отсрочке начала проявления клинических симптомов болезни после инфицирования вирулентным изолятом (P. Gyzmez-Puertas с соавт., 1998). CD2v (или ГП 110-140) — мембранный белок вируса АЧС, определяющий феномен гемадсорбции и охарактеризованный как серотипоспецифический (J.M. Rodriguez с соавт., 1993; А.Д. Середина с соавт., 1992; А. Malogolovkin с соавт., 2014). Поэтому его следует рассматривать как критически важный компонент при создании экспериментальных защитных препаратов (Н.Н. Takamatsu с соавт., 2013). Таким образом, проведенные к настоящему времени исследования свидетельствуют об участии как гуморального, так и клеточного эффекторного механизма иммунитета в формировании защиты при АЧС.

Ключевые слова: африканская чума свиней, протективный иммунитет, антитела, цитотоксические Т-лимфоциты, нормальные киллеры.

Африканская чума свиней (АЧС) — вирусная контагиозная септическая болезнь свиней, характеризующаяся лихорадкой, признаками токсемии, геморрагическим диатезом и высокой летальностью. При острой, наиболее распространенной форме инфекции 100 % животных погибают в течение 5-10 сут после начала проявления клинических признаков. В то же время ряд высокопатогенных для домашних свиней изолятов вируса АЧС (African swine fever virus — ASFV; семейство *Asfarviridae*) не приводят к смертельному исходу у гигантских лесных (*Hylochoerus* spp.), кистеухих (*Potamochoerus porcus* J.E. Gray, 1821), кустарниковых (*Potamochoerus larvatus* F. Cuvier, 1822) свиней, бородавочников (*Phacochoerus africanus* Gmelin, 1788) в Африке. Выделены в природе и получены в лабораторных услови-

ях (при аттенуации в культурах клеток или направленном изменении вирусного генома) множество изолятов, штаммов, вариантов, клонов, которые не вызывают гибели домашних свиней и способны формировать защиту от последующего заражения гомологичными, но не гетерологичными вирулентными изолятами (1-4).

Российскими учеными была экспериментально обоснована классификация изолятов вируса АЧС по сероиммунотипам и получены живые культуральные вакцины из аттенуированных штаммов для временной защиты свиней от вируса АЧС I-V сероиммунотипов (5-7). Все это свидетельствует о развитии у животных иммунной защиты против ASFV.

Исследования в области иммунологии АЧС охватывают вопросы функционального состояния органов и клеток иммунной системы при различных формах течения болезни, механизмов иммуномодулирующего действия вируса на уровне макроорганизма и иммунокомпетентных клеток, сероиммунологического плюрализма возбудителя, поиска протективных белков и др. (5, 7).

Цель представленного обзора — обсуждение роли гуморальных и клеточно-опосредованных механизмов иммунитета в формировании защиты при африканской чуме свиней.

Гуморальный иммунитет. Антитела рассматриваются как необходимый компонент протективного иммунитета при АЧС. Перенос сыворотки или молозива от реконвалесцентов интактным свиньям в случае их последующего заражения вирулентным изолятом ASFV может задержать проявление клинических симптомов болезни, уменьшить вирусемию и увеличить процент выживших особей (8, 9). В частности, пассивный перенос конвалесцентной сыворотки предохранял 85 % свиней от последующего заражения гомологичным изолятом E75 при 100 % гибели контрольных животных, которым вводили иммуноглобулины от интактной особи (10). Однако механизмы гуморального иммунитета при АЧС уже длительное время остаются дискуссионными.

Вируснейтрализующие антитела. Впервые о выявлении антител, нейтрализующих ASFV *in vitro*, сообщили J. Parker и W. Plowright в 1968 году (11). Эксперименты, проведенные различными научными группами в 1980-х годах, позволили прийти к заключению, что вирус не индуцирует такие антитела (12, 13). Однако с 1990-х годов стало появляться все больше работ в поддержку гипотезы о важности вируснейтрализующих антител при формировании защиты от АЧС, что нашло отражение в исчерпывающем обзоре J.M. Escribano с соавт. (14).

Было продемонстрировано, что сыворотка от конвалесцентной свиньи, которой инокулировали аттенуированный штамм E75CV1-4, нейтрализовала в культурах клеток Vero и макрофагах свиньи 86-97 % инфекционности вирулентных изолятов, причем не только исходного изолята E75, но и E70, Lisbon 60, Malawi Lil 20/1, а также E75CV/V3 — культурального варианта E75, получаемого при низком числе пассажей (low passage virus). Неожиданным стал факт, что такие иммунные сыворотки не обладали способностью к нейтрализации вариантов ASFV (Lisbon 60, Haiti, Dominican Republic I, Dominican Republic II, Brazil II) в культурах клеток после многократных пассажей (high passage virus). Сходные результаты были получены с моноклональными антителами к p72. Авторы предположили, что адаптация вируса в процессе пассирования в клеточной культуре приводит к утрате специфических детерминант, которые вовлечены в его нейтрализацию. Однако затем появилось сообщение, что обнаруженные различия не связаны с антигенной структурой вируса и обусловлены изменением

состава фосфолипидов клеточных мембран (14-16).

Исследование сывороток от конвалесцентных животных показало, что при инфекции белки р72, р30 и р54 ASFV наиболее активны по антигенности и иммуногенности. Свиная сыворотка против рекомбинантного белка, который получали при экспрессии конструкции, включающей гены р72 (капсидный белок), р30 и р54 (белки внутренней оболочки), нейтрализовала 70 % инфекционности ASFV. Антитела к р72 и р54 ингибировали прикрепление вирионов к клеткам, в то время как антитела к р30 — проникновение вируса внутрь клеток (17-19). Интересно, что антисыворотка к рекомбинантному оболочечному белку прикрепления р12 не снижала инфекционность ASFV в опытах *in vitro* (16). Иммунизация свиней комбинацией вирусных белков р54 и р30-32 приводила к отсрочке начала проявления клинических симптомов болезни после инфицирования животных вирулентным изолятом (20-22).

Российские исследователи не получили экспериментального подтверждения подобной нейтрализации ASFV. Титрование штамма Ф-32 ASFV после его инкубации с антителами от конвалесцентных животных и комплементом показало отсутствие какого-либо нейтрализующего эффекта, в том числе по типу комплементзависимого виролиза (23). По данным электронной микроскопии, иммунный комплекс вирион—антитело беспрепятственно проникает в чувствительные клетки. По мнению В.В. Макарова (24), специфика макрофагов (клетки-мишени ASFV) заключается прежде всего в их фагоцитирующей способности и исключает необходимость рецепторного механизма начального этапа взаимодействия вируса с клеткой. Кроме того, размеры ASFV делают его объектом компетенции фагоцитоза, при этом опсонизация вирионов в результате образования иммунных комплексов на их поверхности неизбежно благоприятствует проникновению и дезинтеграции за счет опсонин-опосредованной активации фагоцитоза (23, 24). В пользу этой точки зрения свидетельствует опыт иммунизации свиней пулом вирусоспецифических гликопротеинов, очищенных методом аффинной хроматографии. Несмотря на подтвержденные методом иммуноблоттинга высокие значения титров сывороточных антител к широкому спектру гликопротеинов ASFV, фактически сопоставимые с таковыми у переболевших АЧС свиней, после заражения гомологичным вирулентным штаммом животные пали на 2-3 сут раньше контрольных неиммунизированных (А.Д. Середя, неопубликованные данные).

Антителозависимая клеточная цитотоксичность. Часть феноменов, особенно наблюдаемых *in vivo*, которые пытались объяснить нейтрализацией вируса, получили иную трактовку, когда был продемонстрирован опосредованный антителами цитолиз зараженных ASFV моноцитов и макрофагов в реакциях КЗЦ и АЗКЦ (25-27). АЗКЦ регистрировали уже на 3-6-е сут после инокуляции свиньям аттенуированного штамма ФК-135 в дозе 10^8 ГАЕ₅₀ или умеренно вирулентного штамма ФНГ в дозе 10^3 ТЦД₅₀. Поскольку в эти же сроки методом радиоиммунопреципитации в сыворотках крови животных обнаруживали антитела к полипептидам с молекулярной массой 14, 30, 38, 69 и 95 кДа, можно предположить, что именно они (или часть из них) опосредуют цитотоксичность (27). По данным Н.Г. Шубиной с соавт. (28), иммунизация свиней очищенными белками р14, р25, р28, р31, р38 и р73 индуцирует лизис зараженных ASFV клеток по механизмам КЦЗ и АЗКЦ.

Клеточно-опосредованный иммунитет. Имеются факты, указывающие на важную роль клеточно-опосредованных иммунных механизмов для выживания свиней в случае заражения ASFV, в частности

продемонстрировано изменение активности N-киллеров и индукция цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) (29, 30).

Натуральные киллеры. Роль N-киллеров в защите против АЧС была показана в исследованиях с использованием свиней, инокулированных авирулентным изолятом NHV, когда наблюдали две формы инфекции — бессимптомную и хроническую. При острой и подострой формах АЧС активность N-киллеров снижалась на 3-6-е сут после заражения и в дальнейшем приближалась к норме у выживших животных. У свиней с хронической формой АЧС, как и у интактных животных, не наблюдали изменений в активности N-киллеров, но через 14 сут после инфицирования регистрировали лихорадку и вирусемию, а также высокую концентрацию специфических антител. При бессимптомном течении инфекции вирусемию редко наблюдали на поздних стадиях инфекции, концентрация специфических антител к ASFV была относительно низкой, но активность N-киллеров становилась очень высокой. Такие животные оставались клинически здоровыми после заражения вирулентным штаммом L60 (31). Полученные результаты свидетельствуют о важной роли N-киллеров в формировании устойчивости свиней к инфекции ASFV.

Цитотоксические Т-лимфоциты. Значение ЦТЛ в обеспечении вирусоспецифической защиты в ранние сроки после инфицирования ASFV впервые было продемонстрировано в середине 1980-х годов (30, 32, 33). Было показано, что только очищенные CD8⁺ Т-лимфоциты, но не очищенные CD4⁺ лимфоциты обладали киллерной активностью, и эту функцию блокировали анти-CD8⁺ антитела.

Активность ЦТЛ, специфичных к ASFV, исследовалась на инбредных минипигах с разным типом антигенов главного комплекса гистосовместимости свиней SLA (Swine leukocyte antigens) (34). Животных экспериментально инокулировали авирулентным изолятом NHV ASFV. Вторичные ЦТЛ были активированы посредством рестимуляции эффекторных Т-лимфоцитов *in vitro* в культуре клеток лейкоцитов крови, зараженных низкими дозами гомологичного изолята вируса (множественность инфекции — 0,1) в течение 48-72 ч. Оказалось, что активность ЦТЛ лимитируется присутствием и функциональной активностью SLA класса I: во-первых, блокирование антигенов клеток-мишеней моноклональными антителами против SLA класса I приводило к значительному сокращению активности ЦТЛ; во-вторых, наблюдался предпочтительный лизис зараженных ASFV клеток-мишеней с SLA класса I; в-третьих, разрушение клеток-эффекторов CD8⁺ специфическими моноклональными антителами и комплектом приводило к уменьшению активности ЦТЛ. Лизис инфицированных гомологичным вирулентным изолятом L60 макрофагов цитотоксическими Т-лимфоцитами был выше, чем в случае инфицирования макрофагов гетерологичными изолятами DR-II и Tengani (34). Последнее свидетельствовало об иммунотипоспецифичности ЦТЛ.

Решающая роль вирусоспецифических ЦТЛ в защите от АЧС была подтверждена демонстрацией того, что истощение моноклональными антителами *in vivo* пула CD8⁺ Т-лимфоцитов аннулирует защитный иммунитет (35). Если свиньям, инокулированным аттенуированным штаммом OUR/T88/3, через 1 мес после иммунизации в течение 5-6 сут вводили моноклональные антитела против Т-лимфоцитов класса CD8⁺, то такие животные утрачивали защиту от последующего заражения вирулентным штаммом OUR/T88/1, реагируя вирусемией и лихорадкой.

Следует отметить, что методическая возможность выявления первичных ЦТЛ зависит от дозы и биологических свойств штаммов ASFV.

Это наглядно продемонстрировано в исследованиях А.Д. Середы (36), когда ограничение по SLA класса I реализовали благодаря тому, что в качестве мишеней использовали культуру А-клеток лейкоцитов периферической крови, полученную от свиньи до инокуляции ей вируса (0-е сут), а клетками-эффекторами служили аутологичные лимфоциты периферической крови, взятой в период с 1-х по 12-е сут после инокуляции ASFV (37). В присутствии клеток-эффекторов на 6-8-е сут после инфицирования свиней аттенуированным штаммом ФК-135 специфический цитолиз А-клеток, зараженных штаммом ФК-135, достигал 20 % при дозе заражения свиней $10^{8,5}$ ГАЕ₅₀, 5 % — при 10^6 ГАЕ₅₀ и 0 % — при 10^3 ГАЕ₅₀. Инокуляция свиньям вирулентного штамма Ф-32 в перечисленных дозах не индуцировала клеточно-опосредованного цитолиза клеток-мишеней, зараженных штаммами Ф-32 или ФК-135 (36). Последний факт, по-видимому, свидетельствует о том, что у штамма Ф-32 иммунодоминантные эпитопы мишеневого белка определенным образом маскируются. Оказалось, что проблема презентации антигенов проявляется не только на уровне эффекторных реакций, но и на этапе распознавания Т-хелперами. Спленциты свиньи, которой инокулировали штамм ФК-135, в присутствии А-клеток, зараженных штаммом ФК-135, продуцировали интерлейкин 2 (IL-2) в тех же количествах, как и при стимуляции митогенами. В присутствии А-клеток, зараженных умеренно вирулентным штаммом ФНГ, продукция IL-2 была в 2,5 раза ниже, штаммом Ф-32 — в 6-7 раз ниже. Следует отметить, что у спленцитов свиньи, инокулированной штаммом ФК-135, в присутствии аутологичных А-клеток, зараженных гетерологичным в сероиммунотипическом отношении штаммом Мозамбик-78, продукция IL-2 полностью отсутствовала.

Синергизм протективных механизмов иммунитета. На основании длительности инкубационного периода и сроков гибели животных при АЧС можно предположить, что исход заболевания определяется динамикой развития гуморальных и клеточно-опосредованных механизмов защиты в первые дни после инфицирования. Эта гипотеза получила экспериментальное подтверждение на модели с использованием гомологичных штаммов ASFV с неодинаковой вирулентностью — Ф-32 (вирулентный), ФК-135 (авирулентный) и ФНГ (умеренно вирулентный) (36). У свиней, инокулированных штаммом ФК-135 в дозе 10^8 ГАЕ₅₀, опосредованный ЦТЛ и N-киллерами цитолиз зараженных штаммом ФК-135 аутологичных А-клеток лейкоцитов крови, полученных на 0-е сут, достигал максимума на 6-е сут, тогда как у свиней, инфицированных штаммами Ф-32 в дозе 10^3 ГАЕ₅₀ или ФНГ в дозе 10^3 ТЦД₅₀, вирусоспецифический клеточно-опосредованный цитолиз (КОЦ) не обнаружили. В АЗКЦ антителя удавалось выявить, начиная с 3-х сут после инокуляции животных штаммами ФК-135 и ФНГ. У особей, зараженных штаммом Ф-32, активность антител в АЗКЦ обнаружили накануне гибели, то есть на 6-е сут. Таким образом, при заражении штаммом Ф-32 КОЦ и АЗКЦ не регистрировали в течение 3-6-х сут после инфицирования, и эти свиньи пали на 8-е сут. Отсутствие КОЦ на 6-е сут после инфицирования ФНГ в сочетании с наличием АЗКЦ, начиная с 3-х сут, сопровождалось развитием хронической инфекции ASFV. Высокие значения АЗКЦ с 3-х сут после инокуляции штамма ФК-135 и КОЦ на 6-е сут обеспечивали быстрое снижение концентрации вируса в крови на 3-6-е сут, как следствие, клинических симптомов болезни не отмечали.

Роль гуморальных и клеточно-опосредованных механизмов в формировании защиты при АЧС была продемонстрирована в исследованиях по измерению параметров цитотоксичности у свиней, инокулированных

аттенуированным штаммом ФК-135 в дозах от 10^3 - $10^{8,5}$ ГАЕ₅₀. По показателям АЗКЦ и КОЦ, измеренным соответственно на 3-и и 6-е сут, животные были разделены на две группы. В первой показатели АЗКЦ составляли 10-20 %, КОЦ — 3-10 %, во второй — соответственно от 0 до 10 % и около 0 %. После контрольного внутримышечного заражения вирулентным штаммом Ф-32 в дозе 10^3 ГАЕ₅₀ на 7-е сут животные первой группы оставались клинически здоровыми, второй — переболели с лихорадкой в течение 2-3 сут (38).

Культуры лейкоцитов периферической крови свиней можно использовать для исследования *in vitro* иммунологических процессов, происходящих в интересующий период времени *in vivo*. Методически весьма просто разделить культуру лейкоцитов крови на три компонента: адгезированные на стекле клетки-мишени (макрофаги, А-клетки) и осажженные центрифугированием не прикрепившиеся клетки-эффекторы (ЦТЛ + N-киллеры), при этом в надосадке остается среда культивирования с антителами из крови свиней. Были определены конечные результаты действия опосредованных антителами (КЗЦ + АЗКЦ) и клеточно-опосредованных (ЦТЛ + N-киллеры) механизмов иммунитета в ограничении репродукции ASFV штамма Ф-32 в аутологичных модельных системах, сформированных из культур лейкоцитов периферической крови одной и той же свиньи, полученных до и на 6-е сут после иммунизации аттенуированным штаммом ASFV ФК-135 в дозе $10^{7,5}$ ГАЕ₅₀ (39). Накопление ASFV в культуральных системах, включающих лимфоциты и сыворотку, взятых после иммунизации, снижалось на 2,00-2,50 lg ГАЕ₅₀/см³ по сравнению с контролем, когда лимфоциты и сыворотку получали от интактной свиньи. В присутствии лимфоцитов от иммунизированного животного и сыворотки от интактного накопление снижалось на 0,67-0,83 lg ГАЕ₅₀/см³. И, наконец, в присутствии лимфоцитов от интактной свиньи и антител от иммунизированной оно уменьшалось на 1,34-1,83 lg ГАЕ₅₀/см³. Таким образом, на 6-е сут опосредованные антителами механизмы защиты превосходили клеточно-опосредованные по способности ограничивать репродукцию ASFV (39). Судя по полученным результатам, оба типа механизмов действуют синергично, что принципиально важно учитывать при создании рекомбинантных защитных препаратов против возбудителя АЧС. Возможно также, что эффекторные механизмы направлены против различных эпитопов в составе разных вирусоспецифических белков.

Защитная функция антител при АЧС реализуется в механизмах АЗКЦ и КЗЦ. Если предположить, что индуцированные вирусными компонентами популяции Т- и В-лимфоцитов накапливаются с одинаковой скоростью, то раньше следует ожидать эффекта от В-лимфоцитов, поскольку каждая такая клетка производит множество антител, которые N-киллеры могут использовать для атаки зараженных клеток-мишеней. Экспериментально подтверждено, что АЗКЦ можно определить с 3-х сут после заражения, а первичные ЦТЛ — на 6-8-е сут. Вместе с тем, индукцию ЦТЛ следует рассматривать критически важной для эффективного ограничения репродукции вируса (40, 41).

По всей видимости, вирусоспецифическая защита при АЧС обеспечивается набором белков, которые индуцируют механизмы иммунного ответа двух сравниваемых типов, однако изучение структурно-функциональной организации протеинов ASFV пока не позволяет однозначно ответить на вопрос, какие из них могут считаться соответствующими антигенами. Исходя из локализации вирусиндуцированных белков в оболочке вирионов и плазматической мембране зараженных клеток, а также на ос-

новании динамики выявления антител к определенным вирусным белкам и результатов иммунизации свиней различными рекомбинантными конструкциями, претендентами на эту роль признаются, как минимум, р30, р54 и CD2v (42, 43). Последний обуславливает гемадсорбирующие свойства, способствует диссеминации ASFV в организме свиньи, экспрессируется как гликопротеин с молекулярной массой около 105 кДа и обладает иммуномодулирующими свойствами (44-48). По нашему мнению, белку CD2v соответствует мажорный гликопротеин с молекулярной массой 110-140 кДа (ГП 110-140), обнаруженный в плазматической мембране зараженных А-клеток костного мозга свиней. В отличие от других белков ASFV гликопротеин ГП 110-140 серотипоспецифичен (49-51). С учетом установленной сероиммуноспецифичности защиты при АЧС решающая роль CD2v (ГП 110-140) в формировании протективного иммунитета представляется весьма вероятной.

Итак, проведенные к настоящему времени исследования свидетельствуют об участии гуморального и клеточного звеньев иммунитета в формировании защиты при африканской чуме свиней (АЧС). Несмотря на существование экспериментальных доказательств феномена частичной нейтрализации вируса АЧС (African swine fever virus — ASFV) *in vitro*, следует признать, что противоположная точка зрения, согласно которой формирование комплекса антитело—вирион приводит к опсонированному фагоцитозу и, как следствие, к повышению вероятности заражения моноцитов-макрофагов по механизму «троянского коня», представляется более обоснованной, особенно касательно событий, происходящих *in vivo*. Вероятнее всего, гуморальное звено иммунитета реализуется не за счет нейтрализации ASFV, а с участием механизмов комплементзависимого цитолиза (КЗЦ) и антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ). Индукция ЦТЛ также критически важна для эффективного ограничения репродукции вируса. Включение клеточно-опосредованных механизмов защиты, лизис зараженных клеток нормальными киллерами (N-киллерами) и цитотоксическими Т-лимфоцитами (ЦТЛ) обеспечивает выживание свиней или бессимптомное течение инфекции. Индукция ЦТЛ зависит от дозы и биологических свойств штаммов ASFV. Гуморальные и клеточно-опосредованные протективные механизмы действуют синергично, что принципиально важно учитывать при создании рекомбинантных вакцин против АЧС. CD2v (или ГП 110-140) — мембранный белок ASFV, определяющий феномен гемадсорбции и охарактеризованный как серотипоспецифический. Поэтому его следует рассматривать как критически важный компонент при создании экспериментальных защитных препаратов.

*ФГБНУ Всероссийский НИИ ветеринарной
вирусологии и микробиологии,
601120 Россия, Владимирская обл., Петушинский р-н, г. Покров,
e-mail: sereda-56@mail.ru*

*Поступила в редакцию
28 июля 2015 года*

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2015, V. 50, № 6, pp. 709-718

HUMORAL AND CELL IMMUNE MECHANISMS UNDER AFRICAN SWINE FEVER (review)

A.D. Sereda, A.S. Kazakova, A.R. Imatdinov, D.V. Kolbasov

*All-Russian Institute of Veterinary Virology and Microbiology, Russian Academy of Agricultural Sciences,
Pokrov, Petushinskii Region, Vladimir Province, 601120 Russia, e-mail sereda-56@mail.ru*

Abstract

The evidences for protective immunity against African swine fever are symptomless infection in local populations of *Phacochoerus africanus*, *Potamochoerus porcus*, *Hylochoerus* spp. In Africa and experimentally produced avirulent strains of African swine fever virus (ASFV), preventing death in pigs inoculated with its virulent homolog. Serum or colostrum from convalescent animals can delay clinical symptoms, decline viremia and increase the survivors' rate (R.C. Knudsen et al., 1987; D.H. Schlafer et al., 1984; D.V. Onisk et al., 1994). Humoral immune response is most probably due not to ASFV neutralization but the complement-mediated cytotoxicity (CMC) and antibody-mediated cell cytotoxicity (AMCC) (V.V. Makarov, 2013). Cell-mediated defense mechanisms, lyses of infected cells by N-killers and cytotoxic T-lymphocytes (CTL) lead to chronic or symptomless infection (S.G. Norley et al., 1983, 1984). An in vivo depletion of CD8+ T-lymphocytes by monoclonal antibodies was shown to stop protective immunity in pigs pre-immunized with an attenuated ASFV strain under next inoculation with the virulent homolog (C.A.L. Oura et al., 2005). Induction and defector activity of AMCC and CTL depend on the dose and biological features of ASFV strain (A.D. Sereda, 2010). High AMCC since day 3 and activity of cell-mediated mechanisms of immunity on day 6 after the ASFV inoculation provide a rapid decrease of the virus titers in blood, and, consequently, the absence of clinical symptoms (A.D. Sereda et al., 1992). Humoral and cell-dependent defense mechanisms act synergistically that must be taken into consideration when developing candidate recombinant vaccine against ASFV. ASFV candidate proteins involved in antigenic properties which can induce protective mechanisms against ASF are nominated. In pigs immunization with p54 and p30-32 combination caused a delay in appearance of ASF clinical symptoms after the inoculation with virulent isolate (P. Gymez-Puertas et al., 1998). CD2v (or GP 110-140) is a membrane protein of ASFV determining hemadsorption and identified as a serotype specific one (J.M. Rodriguez et al., 1993; A.D. Sereda et al., 1992; A. Malogolovkin et al., 2014). Therefore it should be considered crucial when constructing experimental protective facilities (H.H. Takamatsu et al., 2013). Thus, the investigations conducted to date show both humoral and cell effector mechanisms to be involved in defense against ASF.

Keywords: African swine fever, protective immunity, antibodies, cytotoxic T-lymphocytes, N-killers.

REFERENCES

1. Malmquist W.A. Serologic and immunologic studies with African swine fever virus. *Am. J. Vet. Res.*, 1963, 24: 450-459.
2. Ruiz-Gonzalvo F., Carnero M.E., Bruyel V. Immunological responses of pigs to partially attenuated African swine fever virus and their resistance to virulent homologous and heterologous viruses. *Proc. of EUR 8466 EN: CEC/FAO «African swine fever»*. P.J. Wilkinson (ed.). Sardinia, 1983: 2066-2216.
3. King K., Chapman D., Argilaguët 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 immunization. *Vaccine*, 2011, 29: 4593-4600 (doi: 10.1016/j.vaccine.2011.04.052).
4. Mutowembwal P., Souto R., van Heerden J.H. Vaccination of domestic pigs with a naturally attenuated strain of African swine fever virus. *Proc. of the 9th Annual Congress of the Southern African Society for Veterinary Epidemiology and Preventive Medicine (18-20 August 2010)*. Farm Inn, Republic of South Africa, 2010: 126-128.
5. Sereda A.D., Balyshev V.M. *Voprosy virusologii*, 2011, 4: 38-42.
6. Malogolovkin A., Burmakina G., Titov I., Sereda A., Gogin A., Baryshnikova E., Kolbasov D. Comparative analysis of African swine fever virus genotypes and serogroups. *Emerging Infectious Diseases*, 2015, 21(2): 312-315 (doi: 10.3201/eid2102.140649).
7. Kolbasov D.V., Balyshev V.M., Sereda A.D. *Veterinariya*, 2014, 8: 3-8.
8. Knudsen R.C., Genovesi E.V., Whyard T.C. In vitro immune serum-mediated protection of pig monocytes against African swine fever virus. *Am. J. Vet. Res.*, 1987, 48: 1067-1071.
9. Schlafer D.H., McVicar J.W., Mebus C.A. African swine fever convalescent sows: Subsequent pregnancy and the effect of colostrum antibody on challenge inoculation of their pigs. *Am. J. Vet. Res.*, 1984, 45: 1361-1366.
10. 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).
11. Parker J., Plowright W. Plaque formation by African swine fever virus. *Nature*, 1968, 219(5153): 524-525 (doi: 10.1038/219524a0).

12. Hess W.R. African swine fever: a reassessment. *Adv. Vet. Sci. Compar. Med.*, 1981, 25: 39-69.
13. Viñuela E. African swine fever virus. *Curr. Top. Microbiol. Immunology*, 1985, 116: 151-170.
14. Escribano J.M., Galindo I., Alonso C. Antibody-mediated neutralization of African swine fever virus: myths and facts. *Virus Res.*, 2013, 173: 101-109 (doi: 10.1016/j.virusres.2012.10.012).
15. 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 recognising a 72-kDa viral protein. *Virology*, 1993, 196: 596-602 (doi: 10.1006/viro.1993.1515).
16. Gómez-Puertas P., Rodríguez F., Oviedo J.M., Ramiro-Ibanez 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. *J. Virol.*, 1996, 70(8): 5689-5694.
17. Afonso C.L., Alcaraz C., Brun A., Sussman M.D., Onisk D.V., Escribano J.M., Rock D.L. Characterization of p30, a highly antigenic membrane and secreted protein of African swine fever virus. *Virology*, 1992, 189(1): 368-373 (doi: 10.1016/0042-6822(92)90718-5).
18. Alcaraz C., Rodríguez F., Oviedo J.M., Eiras A., De Diego M., Alonso C., Escribano J.M. Highly specific confirmatory western blot test for African swine fever virus antibody detection using the recombinant virus protein p54. *J. Virol. Meth.*, 1995, 52(1-2): 111-119 (doi: 10.1016/0166-0934(94)00150-F).
19. Rodríguez F., Ley V., Gomez-Puertas P., Garcia R., Rodríguez J.F., Escribano J.M. The structural protein p54 is essential for African swine fever virus viability. *Virus Res.*, 1996, 40(2): 161-167 (doi: 10.1016/0168-1702(95)01268-0).
20. 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.
21. 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).
22. 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.viro.2003.11.011).
23. Makarov V.V., Malakhova M.S., Vlasov N.A. *Doklady VASKHNIL*, 1991, 12: 27-31.
24. Makarov V.V. *Veterinarnaya praktika*, 2013, 3(62): 7-22.
25. Norley S.G., Wardley R.C. Complement-mediated lysis of African swine fever virus-infected cells. *Immunology*, 1982, 46: 75-81.
26. Norley S.G., Wardley R.C. Effector mechanisms in the pig. Antibody-dependent cellular cytotoxicity of African swine fever virus infected cells. *Res. Vet. Sci.*, 1983, 35: 75-79.
27. Sereda A.D., Solovkin S.L., Fugina L.G., Makarov V.V. *Voprosy virusologii*, 1992, 3: 168-170.
28. Shubina N.G., Kolontsov A.A., Peskovatskov A.A., Ustin A.V., Makarov V.V. *Doklady RASKHN*, 1993, 5: 44.
29. Norley S.G., Wardley R.C. Investigation of porcine natural-killer cell activity with reference to African swine fever virus infection. *Immunology*, 1983, 49: 593-597.
30. Norley S.G., Wardley R.C. Cytotoxic lymphocytes induced by African swine fever infection. *Res. Vet. Sci.*, 1984, 37: 255-257.
31. Leitro A., Cartaxeiro C., Coelho R., Cruz B., Parkhouse R.M., Portugal F., Vigario J.D., Martins C.L. 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).
32. Wardley R.C., Norley S.G., Martins C.V., Lawman M.J.P. The host response to African swine fever virus. *Progres en Virologie Medicale*, 1987, 34: 180-192.
33. Alonso F., Dominguez J., Viñuela E., Revilla Y. African swine fever virus-specific cytotoxic T lymphocytes recognize the 32 kDa immediate early protein (vp32). *Virus Res.*, 1997, 49: 123-130 (doi: 10.1016/S0168-1702(97)01459-7).
34. Martins C.L.V., Lawman M.J.P., Scholl T., Mebus C.A., Lunney J.K. African swine fever virus specific porcine cytotoxic T cell activity. *Arch. Virol.*, 1993, 129(1-4): 211-225 (doi: 10.1007/BF01316896).
35. Oura C.A.L., Denyer M.S., Takamatsu H., Parkhouse R.M.E. In vivo depletion of CD8+ T lymphocytes abrogates protective immunity to African swine fever virus. *J. Gen. Virol.*, 2005, 86: 2445-2450 (doi: 10.1099/vir.0.81038-0).
36. Sereda A.D., Solovkin S.L., Senechkina E.K., Makarov V.V. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology]*, 1994, 6: 112-115.
37. Sereda A.D. *Nauchnyi zhurnal KubGAU (Krasnodar)* (IT-resource), 2010, 62(08): 1-9 (<http://ej.ku-bagro.ru/2010/08/pdf/24.pdf>).

38. Makarov V.V., Vishnyakov I.F., Kolomytsev A.A., Sereda A.D. *Byulleten' eksperimental'noi biologii i meditsiny*, 1995, 12: 599-602.
39. Sereda A.D. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology]*, 2013, 4: 59-64 (doi: 10.15389/agrobiology.2013.4.59rus, 10.15389/agrobiology.2013.4.59eng).
40. Makarov V.V. *Afrikanskaya chuma svinei [African swine fever]*. Moscow, 2011.
41. 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).
42. Argilagué J.M., Pérez-Martin E., Gallardo C., Salguero F.J., Borrego B., Lacasta A., Accensi F., Diaz I., Nofrarias M., Pujols J., Blanco E., Pérez-Filgueira M., Escribano J.M., Rodríguez F. Enhancing DNA immunization by targeting ASFV antigens to SLA-II bearing cells. *Vaccine*, 2011, 29: 5379-5385 (doi: 10.1016/j.vaccine.2011.05.084).
43. Argilagué J.M., Pérez-Martin E., Nofrarias 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): 940-942 (doi: 10.1371/journal.pone.0040942).
44. Borca M.V., Kutish G.F., Afonso C.L., Irusta P., Carrillo C., Brun A., Sussman M., Rock D.L. An African swine fever virus gene with similarity to the T-lymphocyte surface antigen CD2 mediates hemadsorption. *Virology*, 1994, 199(2): 463-468 (doi: 10.1006/viro.1994.1146).
45. Rodríguez J.M., Yanez R.J., Almazan F., Vinuela E., Rodríguez J.F. African swine fever virus encodes a CD2 homolog responsible for the adhesion of erythrocytes to infected cells. *Journal of Virology*, 1993, 67(9): 5312-5320.
46. Kay-Jackson P.C., Goatley L.C., Cox L., Miskin J.E., Parkhouse R.M.E., Wienands J., Dixon L.K. The CD2v protein of African swine fever virus interacts with the actin-binding adaptor protein SH3P7. *J. Gen. Virol.*, 2004, 85: 119-130 (doi: 10.1099/vir.0.19435-0).
47. Dixon L.K., Abrams C.C., Bowick G., Goatley L.C., Kay-Jackson P.C., Chapman D., Liverani E., Nix R., Silk R., Zhang F. African swine fever virus proteins involved in evading host defence systems. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 2004, 100: 117-134 (doi: 10.1016/j.vetimm.2004.04.002).
48. 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).
49. Sereda A.D., Makarov V.V. *Veterinariya*, 1992, 1: 22-24.
50. Sereda A.D., Anokhina E.G., Makarov V.V. *Voprosy virusologii*, 1994, 39(6): 278-281.
51. Malogolovkin A., Burmakina G., Tulman E.R., Delhon G., Diel D.G., Salnikov N., Kutish G.F., Kolbasov D., Rock D.L. African swine fever virus CD2v and C-type lectin gene loci mediate serologic specificity. *J. Gen. Virol.*, 2015, 96: 866-873 (doi: 10.1099/jgv.0.000024).