

Respons Imun Mencit terhadap Vaksin DNA Virus Demam Babi Afrika A224L dan A276R dengan Enkapsulasi Lipofektamin, Kolesterol dan Polimer

*(IMMUNE RESPONSE OF MICE TO AFRICAN SWINE FEVER VIRUS
DNA VACCINE A224L AND A276R WITH LIPOFECTAMINE,
CHOLESTEROL AND POLYMER ENCAPSULATION)*

**Sylvia Kamil¹, I Gusti Ngurah Kade Mahardika²,
Ida Bagus Kade Suardana³**

¹Mahasiswa Sarjana Pendidikan Dokter Hewan;
²Laboratorium Biomedik dan Biologi Molekuler;
³Laboratorium Virologi Veteriner
Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana;
Jl. Sudirman, Sanglah, Denpasar, Bali, Indonesia 80234.
Tlp. (0361) 701808, 223791
E-mail: sylviakamil@student.unud.ac.id

ABSTRACT

A vaccine against African Swine Fever (ASF) is urgently needed to reduce losses for pig farmers throughout the world. The study was aimed to test the immune response of mice to an ASF-DNA vaccine with the A224L and A276R genes with polymer, lipofectamine, and cholesterol adjuvants. Each mouse was vaccinated intramuscularly with 25 µg of plasmid encapsulated with the above adjuvants. Mouse sera were collected at weeks 1, 2, 3 and 4. Antibodies against A224L and A276R were detected by ELISA test using synthetic peptides as antigens. Optical density (OD) values were analysed statistically using the Analysis of Variance test with the SPSS Version 25. The results showed that the OD values of the serum of mice given the ASF-A224L and A276R DNA vaccines with polymer adjuvants (0.149), lipofectamine (0.080), and cholesterol (0.058), as well as control mice (0.020) differed significantly ($p=0.000$), while the time of serum collection had no significant effect ($p=0.517$). The conclusion is that the OD values of mice sera after DNA-ASF-A224L and A276R encapsulated with polymer, lipofectamine and cholesterol were statistically significant, while sampling time did not show any statistically difference. Further studies are needed to improve the adjuvant mixing protocol with larger quantities of plasmids.

Keywords: mice; DNA vaccine; ASF; polymer; ELISA

ABSTRAK

Vaksin terhadap penyakit Demam Babi Afrika (*African Swine Fever*/ASF) sangat diperlukan untuk mengurangi kerugian peternak babi di seluruh dunia. Penelitian ini bertujuan memaparkan pengujian vaksin DNA-ASF dengan gen A224L dan A276R pada mencit dengan adjuvan polimer, lipofektamin dan kolesterol. Setiap mencit divaksinasi secara intramuskuler dengan 25 µg plasmid yang dienkapsulasi dengan adjuvan tersebut. Serum mencit dikumpulkan pada minggu ke-1, 2, 3 dan 4. Antibodi terhadap A224L dan

A276R dideteksi dengan uji ELISA menggunakan peptida sintetik A224L dan A276R sebagai antigen. Nilai *optical density* (OD) dianalisis secara statistika menggunakan uji sidik ragam dengan aplikasi SPSS Versi 25. Hasil penelitian menunjukkan nilai OD serum mencit yang diberikan vaksin DNA ASF-A224L dan A276R dengan adjuvan polimer (0,149), lipofektamin (0,080) dan kolesterol (0,058), serta mencit kontrol (0,020) berbeda sangat nyata ($p=0,000$), sementara waktu pengambilan serum tidak berpengaruh nyata ($p=0,517$). Simpulannya adalah nilai OD ELISA serum mencit yang diberikan vaksin DNA ASF-A224L dan A276R antarperlakuan adjuvan polimer, lipofektamin, kolesterol, dan kontrol secara statistika berbeda sangat nyata ($p=0,000$), sedangkan waktu pengambilan serum secara statistika tidak berpengaruh nyata ($p=0,517$) terhadap nilai OD ELISA serum mencit yang diberikan vaksin DNA ASF-A224L dan A276R. Kajian lebih lanjut diperlukan untuk memperbaiki protokol pencampuran adjuvan dengan plasmid menggunakan kuantitas lebih banyak.

Kata-kata kunci: mencit; vaksin DNA; ASF; polimer; ELISA

PENDAHULUAN

Penyakit Demam Babi Afrika (*African Swine Fever*/ASF) adalah penyakit virus pada babi dengan tingkat kematian tinggi sampai 100% (Oura dan Arias, 2021). Penyakit ASF ini menyebabkan kerugian ekonomi yang besar bagi peternak babi (Ayanwale *et al.*, 2022; Gallardo *et al.*, 2017; Hershey *et al.*, 2021). Vaksin terhadap penyakit ASF ini hingga kini sedang dalam masa pengembangan (Zhang *et al.*, 2023).

Virus ASF termasuk virus yang unik. Virus ini adalah virus DNA dengan nukleositoplasma besar dengan struktur *multilayer* dan bermorfologi kompleks; genomnya terdiri atas 170-193kb DNA beruntai ganda yang mengkode lebih dari 150 protein (Dixon *et al.*, 2013). Virus ini berasal dari keluarga *Asfarviridae* (Alkhamis *et al.*, 2018; Aslanyan *et al.*, 2020; Dixon *et al.*, 2013). Virus ASF dapat ditularkan oleh arthropoda berupa caplak lunak (Anderson *et al.*, 1998).

Penyakit ASF diidentifikasi pertama kali di Kenya pada tahun 1920 (Hakizimana *et al.*, 2021; Penrith dan Kivaria, 2022). Virus ASF menyebar ke Asia, yaitu ke Tiongkok (Zhao *et al.*, 2022), Vietnam (Nguyen *et al.*, 2023), Filipina (Hsu *et al.*, 2023), Korea Selatan (Tiwari *et al.*,

2022), Timor Leste (Smith *et al.*, 2019), dan Indonesia (Dharmayanti *et al.*, 2021). Penyakit ASF ini juga sudah dilaporkan keberadaanya di Provinsi Bali dan Nusa Tenggara Timur (Tenaya *et al.*, 2023).

Vaksin ASF belum dipasarkan di dunia. Vaksin terhadap penyakit ASF ini masih dalam tahap pengembangan (Zhang *et al.*, 2023a). Vaksin ASF sulit dikembangkan karena virus ASF sulit dibiakkan di dalam biakan sel dan target ASF adalah sel makrofag sehingga inisiasi respons imun terganggu. Fagositosis oleh makrofag menyebabkan infeksi sel dan memperparah gejala klinis (Dixon *et al.*, 2019). Laboratorium Biomedik dan Biologi Molekuler FKH UNUD mengembangkan prototipe vaksin DNA ASF berisi gen penyandi protein virus ASF A224L dan A276R. Tahap sebelumnya, vaksin disuntikkan pada mencit dengan lipofektamin dan kolesterol (Mahardika *et al.*, 2023). Karena adjuvan relatif mahal dan tidak tersedia di Indonesia untuk produksi massal. Alternatif yang hendak dicoba adalah menggunakan polimer komersial yang sudah diregistrasi di Indonesia. Polimer sudah dipublikasi sebagai alternatif pembawa vaksin DNA (Karpenko *et al.*, 2020; Zajac *et al.*, 2023; Zhang *et al.*, 2017). Mekanisme kerja adjuvan polimer secara umum terdiri atas peningkatan depot

antigen, aktivasi sel dendritik, peradangan terkontrol, pengaturan respons kekebalan, dan proliferasi sel T dan B (Karpenko *et al.*, 2020; Nguyen *et al.*, 2009).

Penelitian ini bertujuan memaparkan proses pengembangan vaksin DNA ASF dengan gen A224L dan A276R, serta pengujian pada mencit dengan adjuvan polimer, dibandingkan dengan lipofektamin dan kolesterol.

METODE PENELITIAN

Plasmid DNA

Plasmid DNA rekombinan yang digunakan adalah pGNM2022 terdaftar paten nomor pendaftaran S00202310363 berisi gen A224L dan A276R virus ASF. Plasmid itu berisi promoter *human cytomegalovirus* (hCMV) dan situs *bovine growth hormone poly-A* sehingga dikenal oleh sistem transkripsi sel hewan dan menghasilkan mRNA eukariotik yang mempunyai ekor-AAAA(n) pada ujung-3'.

Protokol Enkapsulasi Vaksin DNA-ASF A224L dan A276R dengan Lipofektamin dan Kolesterol

Vaksin dipreparasikan menjadi vaksin dosis tinggi sebesar 10 µg dalam 200 µL. Vaksin diformulasikan untuk 15 dosis. Formulasi lipofektamin dari vaksin masing-masing dosis terdiri atas dua campuran, yaitu campuran 1 dan 2. Formulasi dari vaksin dengan dosis tinggi adalah: Campuran 1 terdiri atas 1,125 mL media Gibco Opti-mem (Thermo-Fisher®) dicampurkan dengan lipofektamin 3000 sebanyak 225 mL; Campuran 2 terdiri atas 2,250 mL media Gibco Opti-mem dicampurkan dengan reagen p3000 sebanyak 300 µL dan 150 µg plasmid DNA-ASF A224L dan A276R untuk masing-masing vaksin. Campuran 1 dan campuran 2 digabungkan.

Protokol Enkapsulasi Vaksin DNA-ASF A224L dan A276R dengan Polimer

Plasmid diencerkan 5000 µg plasmid dengan NaCl fisiologis steril sehingga volume akhir menjadi 462,5 mL dan dihomogenkan dengan *ultra-turrax* dengan kecepatan 10.000 rpm; Polimer komersial ditambahkan 37,5 mL dengan penambahan 1 mL tiap sepuluh detik ke dalam larutan plasmid tersebut, kemudian dihomogenkan pada *ultra-turrax* dengan kecepatan 10.000 rpm. Campuran itu dihomogenkan pada *ultra-turrax* dengan kecepatan 10.000 rpm selama 15 menit. Thimerosal dihomogenkan 50 µL ke dalam campuran dan dihomogenkan pada *ultra-turrax* dengan kecepatan 10.000 rpm selama satu menit. Campuran disimpan pada suhu 4°C sampai digunakan.

Protokol Injeksi Mencit

Mencit jantan sehat berumur empat minggu, dikelompokkan secara acak. Mencit dibagi menjadi empat kelompok, yaitu tiga kelompok mencit perlakuan dan satu kelompok kontrol dengan masing-masing kelompok berisi lima ekor mencit. Kelompok perlakuan terdiri atas satu kelompok dengan perlakuan lipofektamin, satu kelompok dengan perlakuan kolesterol, satu kelompok dengan perlakuan polimer.

Vaksin disuntikkan secara intramuskuler pada otot paha. Serum mencit diambil setiap minggu selama empat minggu pada *vena fascialis*. Pengambilan sampel serum mencit menggunakan jarum suntik ukuran 23G. Darah mencit diambil sebanyak 500 µL pada *vena facialis*, darah ditampung dengan *microcentrifuge tube* berukuran 1,5 mL. Tabung diletakkan dalam posisi horizontal agar serum terpisah dari plasma dengan sempurna. Serum yang telah terpisah ditempatkan pada *microcentrifuge tube* 1,5 mL dan disimpan di lemari es dengan suhu -20°C.

Protokol ELISA

Serum mencit perlakuan diuji *Enzyme Linked Immunosorbent Assay/ELISA* menggunakan *well ELISA* dan *coating Buffer* Laboratorium Biomedik FKH UNUD. Tahap pertama *coating* protein selama 24 jam dengan protein A224L dan A276R yang tersedia di Laboratorium Biomedik FKH UNUD. *Plate* dicuci dan *di-blocking* menggunakan susu skim 5%. *Plate* selanjutnya dicuci dengan PBS-*tween* (campurkan larutan aquabidest 900 mL, *Phospat Buffer Saline* (PBS) 100 mL, dan Tween 500 μ L sebanyak tiga kali. Serum mencit diencerkan 50 kali pada PBS-*tween* dan diinkubasi selama 1 jam. Setelah pencucian tersebut, antibodi sekunder *goat anti-mouse* IgG diencerkan 1:500 dengan PBS-*tween* dan diinkubasi selama satu jam. Perubahan warna diamati selama 30 menit setelah penambahan *Substrate Alkaline Phosphatase yellow (pNPP)* (Sigma). Nilai kepekatan optik (*optical density/OD*) diukur dengan *ELISA Reader Stat Fax 2100* pada panjang gelombang 405 nm.

Analisis Data

Data OD ELISA dianalisis dengan uji sidik ragam. Jika terdapat perbedaan yang nyata, nilai tengah diuji dengan *Tukey Honestly Significant Difference (Tukey HSD)* menggunakan aplikasi SPSS.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pengukuran nilai OD serum mencit percobaan pada minggu ke-1, 2, 3, dan 4 pada kelompok kontrol, perlakuan lipofektamin (P1), kolesterol (P2), dan polimer (P3), serta nilai rata-rata setiap perlakuan setiap minggu disajikan pada Tabel 1. Nilai OD tertinggi adalah 0,412 dan terendah adalah 0,000. Nilai rata-rata tertinggi (0,183) diperoleh pada perlakuan P3 pada minggu ketiga dan keempat. Nilai OD serum mencit yang diberikan vaksin DNA

ASF-A224L dan A276R dengan adjuvan polimer (0,149), lipofektamin (0,080), dan kolesterol (0,058), serta mencit kontrol (0,020) berbeda sangat nyata ($p=0,000$), sementara waktu pengambilan serum tidak berpengaruh nyata ($p=0,517$).

Hasil Uji sidik ragam menunjukkan nilai rata-rata perlakuan yang secara statistika berbeda nyata ($p<0,05$) adalah kontrol dengan P1, kontrol dengan P3, P1 dengan P3, dan P2 dengan P3. Diagram batang nilai OD rata-rata semua kelompok perlakuan dan kontrol pada setiap minggu pengamatan ditampilkan pada Gambar 1.

Uraian terperinci tentang pengaruh perlakuan dan waktu pengambilan serum menunjukkan bahwa nilai OD ELISA serum mencit yang diberikan vaksin DNA ASF A224L dan A276R dengan perlakuan adjuvan polimer (OD 0,149) secara statistika nyata lebih tinggi, dibandingkan dengan kontrol (OD 0,020; $p=0,000$), adjuvan lipofektamin (OD 0,080; $p=0,046$), dan adjuvan kolesterol (OD 0,058; $p=0,003$), di samping itu, nilai OD ELISA serum mencit yang diberikan vaksin DNA ASF-A224L dan A276R dengan perlakuan adjuvan lipofektamin secara statistika nyata lebih tinggi, dibandingkan dengan kontrol ($p=0,049$), sementara dibandingkan dengan adjuvan kolesterol secara statistika tidak berbeda nyata ($p=0,754$).

Penelitian ini merupakan yang pertama menggunakan vaksin DNA adjuvan polimer di Indonesia. Penelitian sebelumnya yang dilaporkan oleh Dewi *et al.* (2022); Mahardika *et al.* (2023) menggunakan adjuvan lipofektamin. Sementara itu Danaeifar *et al.* (2023) sudah melaporkan penelitian tentang vaksin DNA untuk manusia menggunakan adjuvan polimer untuk terapi kanker. Vaksin DNA sudah diedarkan untuk Covid-19 di India (Dey *et al.*, 2021).

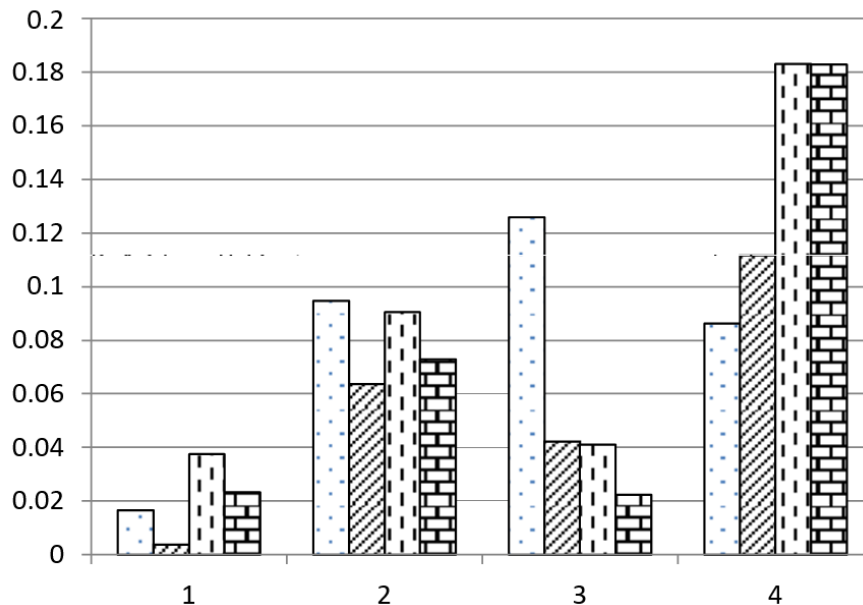
Tabel 1. Nilai *Optical Density* (OD) Serum Mencit yang Divaksinasi dengan Vaksin DNA ASF A224L dan A276R yang Diambil pada Minggu ke-1, 2, 3, dan 4 Setelah Vaksinasi

Minggu ke-	Ulangan	Kontrol	P1	P2	P3
1	1	0	0.165	0.041	0.102
	2	0	0.081	0.069	0.031
	3	0.06	0.073	0.173	0.091
	4	0.023	0.016	0.159	0.202
	5	0	0.138	0.187	0.005
	Rataan	0.0166	0.0946	0.1258	0.0862
2	1	0	0.032	0.067	0.34
	2	0	0.083	0	0.081
	3	0	0.109	0	0.081
	4	0.019	0.089	0.144	0.042
	5	0	0.005	0	0.014
	Rataan	0.0038	0.0636	0.0422	0.1116
3	1	0	0.165	0.001	0.182
	2	0.005	0.081	0.068	0.412
	3	0	0.033	0.124	0.14
	4	0.084	0.167	0.012	0.104
	5	0.099	0.006	0	0.077
	Rataan	0.0376	0.0904	0.041	0.183
4	1	0.005	0.082	0.016	0.365
	2	0.014	0.155	0	0.15
	3	0.045	0.05	0.048	0.144
	4	0.048	0.017	0.048	0.187
	5	0.005	0.06	0	0.068
	Rataan	0.0234	0.0728	0.0224	0.1828
	Rataan total*	0.020 ^a	0.080 ^b	0.058 ^b	0.141 ^c

Keterangan: Huruf yang sama artinya secara statistik tidak berbeda nyata ($p > 0.05$).
Huruf yang berbeda artinya secara statistik berbeda nyata ($p < 0,05$).

Keunggulan vaksin DNA adalah biaya produksi yang murah dan vaksinnya stabil. Penggunaan vaksin DNA pada laporan penelitian lain menunjukkan respons antibodi yang kuat pada mencit (Dupuy *et al.*, 2011). Dari artikel tinjauan pustaka disebutkan bahwa vaksin DNA sudah diujicobakan untuk penyakit toksoplasma dan cacing hati (Jayaraj *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2023b) dan pada ikan (Tonheim *et al.*, 2008). Penggunaan polimer juga telah diujicobakan (Danaeifar *et al.*, 2023).

Penggunaan untuk hewan masih terbatas sebagai hewan coba untuk vaksin manusia, termasuk untuk Covid-19 (Andrade *et al.*, 2023; Bergman *et al.*, 2006; Dey *et al.*, 2021). Penggunaan vaksin DNA untuk virus ASF juga sudah dilaporkan, walaupun hasilnya belum baik (Sereda *et al.*, 2023). Hal-hal penting yang masih dipermasalahkan dalam vaksin DNA adalah keamanan, potensi integrasi pada kromosom, distribusi di jaringan, toleransi dan autoimun (Smith, 2000).



Gambar 1. Diagram Batang Nilai OD Rata-rata Semua Kelompok Perlakuan dan Kontrol pada Setiap Minggu Pengamatan. 1 = kontrol; 2 = P1 (adjuvan lipofektamin); 3 = P2 (adjuvan kolesterol); 4 = P3 (adjuvan polimer); Kotak arsir titik-titik: minggu kesatu; Kotak arsir melintang: minggu kedua; Kotak arsir garis putus-putus vertikal: minggu ketiga; Kotak arsir bata: minggu keempat.

Keunggulan vaksin DNA adalah fleksibilitas dan kecepatan produksi, stabilitas, respons imun yang lebih komprehensif, kemampuan mengatasi variasi virus, tidak memerlukan virus aktif, serta aman (Conforti *et al.*, 2022; Dey *et al.*, 2021; Khalid dan Poh, 2023).

Sepanjang penelusuran penulis, eksperimen dengan DNA dan polimer ini adalah yang pertama di Indonesia sehingga perlu dimatangkan lebih lanjut. Nilai OD yang diperoleh tertinggi adalah 0,412 dan terendah adalah 0,000. Nilai rata-rata tertinggi (0,183) diperoleh pada perlakuan P3 pada minggu ketiga dan keempat.

Penggunaan adjuvan polimer menghasilkan nilai OD lebih tinggi, dibandingkan lipofektamin yang merupakan pembawa DNA atau mRNA baku internasional (Kozak *et al.*, 2013; Pardi *et al.*, 2018; Rose *et al.*, 2018; Shakya dan Nandakumar, 2023). Laporan penelitian sebelumnya dengan lipofektamin menghasilkan nilai OD tertinggi sebesar

0,452 (Mahardika *et al.*, 2023). Peneliti lain melaporkan nilai OD tertinggi sebesar 1,161 (Dewi *et al.*, 2022). Kemungkinan alasan rendahnya nilai OD dengan lipofektamin pada penelitian ini karena konsentrasi DNA yang relatif rendah sehingga memerlukan volume yang lebih besar. Ini menyebabkan kontak lipofektamin dengan DNA tidak optimal. Hal ini perlu dikaji lebih lanjut.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa nilai rata-rata perlakuan yang secara statistika berbeda nyata ($p < 0,05$) adalah kontrol dengan P1, kontrol dengan P3, P1 dengan P3, dan P2 dengan P3, atau dengan kata lain, perlakuan dengan polimer (P3) menghasilkan nilai OD yang tertinggi pada minggu ketiga dan keempat. Hasil itu juga tergambar dengan jelas pada Gambar 1. Pada Gambar 1 tersebut menunjukkan bahwa respons imun dengan adjuvan polimer sudah tampak pada minggu kesatu dan meningkat sampai minggu keempat. Nilai OD setelah itu tidak diketahui karena penelitian sudah dihentikan.

Walaupun nilai OD masih rendah artinya respons imun belum optimal, penelitian ini menunjukkan bahwa polimer dapat digunakan sebagai pembawa vaksin DNA. Adapun respons imun yang masih belum optimal perlu dikaji lebih lanjut. Dalam penelitian ini, polimer ditambahkan terakhir setelah DNA dicampur dengan NaCl fisiologis untuk memperoleh volume vaksin yang diperlukan sehingga interaksi polimer dengan DNA menjadi tidak optimal. Salah satu perbaikan yang dapat disarankan adalah sejumlah volume polimer perlu dicampurkan dengan DNA dalam volume yang sama dan dihomogenkan terlebih dahulu sebelum ditambahkan volume pengencer sesuai keperluan.

Walaupun nilainya masih rendah, hasil ELISA dalam uji ini dapat dikatakan khas. Uji ELISA adalah metode laboratorium yang digunakan untuk mendeteksi keberadaan atau konsentrasi suatu substansi tertentu dalam sampel cairan biologis, seperti darah, urine, saliva, atau cairan lainnya. Dasar metode ELISA berprinsip bahwa antibodi atau antigen tertentu akan berinteraksi secara spesifik dengan target yang diinginkan. Reaksi diukur dengan mengukur aktivitas enzim yang dikonjugasikan pada antibodi terhadap substrat yang sesuai (Dita 2021; Tignon *et al.*, 2011).

Pada penelitian ini, nilai kelompok kontrol antara 0,00–0,03 yang menunjukkan bahwa ELISA yang digunakan spesifik. Nilai OD pada kelompok P3 dengan adjuvan polimer pada minggu ketiga dan keempat setelah vaksinasi (nilai OD 0,183 dan 0,1828) secara statistika nyata lebih tinggi, dibandingkan kontrol (OD 0,0376 dan 0,0234) dan P2 dengan adjuvan kolesterol (OD 0,041 dan 0,0224). Hal tersebut disajikan pada Tabel 1 dan Gambar 1.

Protokol pencampuran adjuvan dengan DNA dalam penelitian ini perlu diuji lebih lanjut dan kuantitas DNA perlu dinaikkan. Penelitian ini menggunakan

dosis 25 µg per hewan coba. Peneliti lain pada mencit menggunakan 50-100 µg per hewan coba (Degan *et al.*, 1998). Hal ini tampaknya juga menyebabkan nilai OD yang diamati relatif masih rendah dalam penelitian ini.

Nilai OD ELISA serum mencit yang diberikan vaksin DNA ASF-A224L dan A276R antarperlakuan adjuvan polimer, lipofektamin, kolesterol, dan kontrol secara statistika berbeda sangat nyata ($p=0,000$), di samping itu, waktu pengambilan serum secara statistika tidak berpengaruh nyata ($p=0,517$) terhadap nilai OD ELISA serum mencit yang diberikan vaksin DNA ASF-A224L dan A276R dengan adjuvan polimer, lipofektamin dan kolesterol.

SIMPULAN

Nilai OD ELISA serum mencit yang diberikan vaksin DNA ASF-A224L dan A276R antarperlakuan adjuvan polimer (OD 0,141), lipofektamin (OD 0,080), kolesterol (OD 0,058), dan kontrol (OD 0,020) berbeda sangat nyata ($p=0,000$). Waktu pengambilan serum tidak berpengaruh nyata ($p=0,517$) terhadap nilai OD ELISA serum mencit yang diberikan vaksin DNA ASF-A224L dan A276R dengan adjuvan polimer, lipofektamin dan kolesterol

SARAN

Protokol pencampuran adjuvan dengan DNA perlu diuji lebih lanjut dan kuantitas DNA perlu ditingkatkan.

DAFTAR PUSTAKA

Alkhamis MA, Gallardo C, Jurado C, Soler A, Arias M, Sanchez-Vizcaino JM. 2018. Phylodynamics and evolutionary epidemiology of African swine fever p72-CVR genes in Eurasia and Africa. *PLoS One* 13: e0192565.

- Anderson EC, Hutchings GH, Mukarati N, Wilkinson PJ. 1998. African swine fever virus infection of the bushpig (*Potamochoerus porcus*) and its significance in the epidemiology of the disease. *Vet Microbiol* 62: 1-15.
- Andrade VM, Maricic I, Kalia R, Jachimowicz L, Bedoya O, Kulp DW, Humeau L, Smith TRF. 2023. Delineation of DNA and mRNA COVID-19 vaccine-induced immune responses in preclinical animal models. *Hum Vaccin Immunother* 19: 2281733.
- Aslanyan L, Avagyan H, Karalyan Z. 2020. Whole-genome-based phylogeny of African swine fever virus. *Vet World* 13: 2118-2125.
- Ayanwale A, Trapp S, Guabiraba R, Caballero I, Roesch F. 2022. New Insights in the Interplay Between African Swine Fever Virus and Innate Immunity and Its Impact on Viral Pathogenicity. *Front Microbiol* 13: 958307.
- Bergman PJ, Camps-Palau MA, McKnight JA, Leibman NF, Craft DM, Leung C, Liao J, Riviere I, Sadelain M, Hohenhaus, AE, Gregor P, Houghton, AN, Perales MA, Wolchok JD. 2006. Development of a xenogeneic DNA vaccine program for canine malignant melanoma at the Animal Medical Center. *Vaccine* 24: 4582-4585.
- Conforti, A, Marra, E, Palombo F, Roscilli G, Rava M, Fumagalli, V, Muzi A, Maffei M, Luberto L, Lione L, Salvatori E, Compagnone M, Pinto E, Pavoni E, Bucci F, Vitagliano G, Stoppoloni D, Pacello ML, Cappelletti M, Ferrara FF, D'Acunto E, Chiarini V, Arriga R, Nyska A, Di Lucia P, Marotta D, Bono E, Giustini L, Sala E, Perucchini C, Paterson J, Ryan KA, Challis AR, Matusali G, Colavita F, Caselli G, Criscuolo E, Clementi N, Mancini N, Gross R, Seidel A, Wettstein L, Munch J, Donnici L, Conti M, De Francesco R, Kuka M, Ciliberto G, Castilletti C, Capobianchi MR, Ippolito G, Guidotti LG, Rovati L, Iannacone M, Aurisicchio L. 2022. COVID-eVax, an electroporated DNA vaccine candidate encoding the SARS-CoV-2 RBD, elicits protective responses in animal models. *Mol Ther* 30: 311-326.
- Danaeifar M, Negahdari B, Eslam HM, Zare H, Ghanaat M, Koushali SS, Malekshahi ZV. 2023. Polymeric nanoparticles for DNA vaccine-based cancer immunotherapy: a review. *Biotechnol Lett* 45: 1053-1072.
- Degano P, Sarphie DF, Bangham CR. 1998. Intradermal DNA immunization of mice against influenza A virus using the novel PowderJect system. *Vaccine* 16: 394-398.
- Dewi NPS, Mahardika IG, Suardana IBK. 2022. Studi Pendahuluan Pengembangan Vaksin DNA Menggunakan Gen Nukleoprotein Virus SARS-CoV-2. *Buletin Veteriner Udayana* 15.
- Dey A, Chozhavel Rajanathan TM, Chandra H, Pericherla HPR, Kumar S, Choonia HS, Bajpai M, Singh AK, Sinha A, Saini G, Dalal P, Vandriwala S, Raheem MA, Divate RD, Navlani NL, Sharma V, Parikh A, Prasath S, Sankar Rao M, Maithal K. 2021. Immunogenic potential of DNA vaccine candidate, ZyCoV-D against SARS-CoV-2 in animal models. *Vaccine* 39: 4108-4116.
- Dharmayanti NLPI, Sendow I, Ratnawati A, Settypalli TBK, Saepulloh M, Dundon WG, Nuradji H, Naletoski I, Cattoli G, Lamien CE. 2021. African swine fever in North Sumatra and West Java provinces in 2019 and 2020, Indonesia. *Transbound Emerg Dis* 68: 2890-2896.

- Dita MC. 2021. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA): A Narrative Literature Review. *Natural Sciences Engineering and Technology Journal* 1: 24-31.
- Dixon LK, Chapman DA, Netherton CL, Upton C. 2013. African swine fever virus replication and genomics. *Virus Res* 173: 3-14.
- Dixon LK, Islam M, Nash R, Reis AL. 2019). African swine fever virus evasion of host defences. *Virus Res* 266: 25-33.
- Dupuy LC, Richards MJ, Ellefsen B, Chau L, Luxembourg A, Hannaman D, Livingston BD, Schmaljohn CS. 2011. A DNA vaccine for venezuelan equine encephalitis virus delivered by intramuscular electroporation elicits high levels of neutralizing antibodies in multiple animal models and provides protective immunity to mice and nonhuman primates. *Clin Vaccine Immunol* 18: 707-716.
- Gallardo C, Soler A, Nieto R, Cano C, Pelayo V, Sanchez MA, Pridotkas G, Fernandez-Pinero J, Briones V, Arias M. 2017. Experimental Infection of Domestic Pigs with African Swine Fever Virus Lithuania 2014 Genotype II Field Isolate. *Transbound Emerg Dis* 64: 300-304.
- Hakizimana JN, Yona C, Kamana O, Nauwynck H, Misinzo G. 2021. African Swine Fever Virus Circulation between Tanzania and Neighboring Countries: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Viruses* 13.
- Hershey BJ, Hagart JL, Havas KA. 2021. Clinical Indicators of Moribundity in Swine Experimentally Inoculated with African Swine Fever Virus. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 60: 96-102.
- Hsu CH, Schambow R, Montenegro M, Miclat-Sonaco R, Perez A. 2023. Factors Affecting the Spread, Diagnosis, and Control of African Swine Fever in the Philippines. *Pathogens* 12.
- Jayaraj R, Kumarasamy C, Norbury L, Piedrafita D, Smooker P. 2019. Protective efficacy of liver fluke DNA vaccines: A systematic review and meta-analysis: Guiding novel vaccine development. *Vet Parasitol* 267: 90-98.
- Karpenko LI, Apartsin, EK, Dudko SG, Starostina EV, Kaplina ON, Antonets DV, Volosnikova EA, Zaitsev BN, Bakulina AY, Venyaminova AG, Ilyichev AA, Bazhan SI. 2020. Cationic Polymers for the Delivery of the Ebola DNA Vaccine Encoding Artificial T-Cell Immunogen. *Vaccines (Basel)* 8.
- Khalid K, Poh CL. 2023. The development of DNA vaccines against SARS-CoV-2. *Adv Med Sci* 68: 213-226.
- Kozak MR, Oliinyk AV, Zaichenko OS, Vlizio VV. 2013. [Adjuvant properties of polymer based on acrylic acid]. *Ukr Biokhim Zh (1999)* 85: 69- 73.
- Mahardika GNBK, Pharmawati M, Ramona Y. 2023. Detection of mRNA and Anibody in Mice Injected with Plasmid pCDNA3.1-SRM Carrying African Swine Fever Virus Gen Able to Produce Self-Replicating RNA. *Jurnal Veteriner* 24(2): 201-208..
- Nguyen DN, Green JJ, Chan JM, Longer R, Anderson DG. 2009. Polymeric Materials for Gene Delivery and DNA Vaccination. *Adv Mater* 21: 847-867.
- Nguyen TTH, Nguyen VT, Le PN, Mai NTA, Dong VH, Bui TAD, Nguyen TL, Ambagala A, Le VP. 2023. Pathological Characteristics of Domestic Pigs Orally Infected with the Virus Strain Causing the First Reported African Swine Fever Outbreaks in Vietnam. *Pathogens* 12.
- Oura CAL, Arias M. 2021. African Swine Fever (Infection with African Swine Fever Virus), In: OIE (Ed.) *Manual*

- of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals* 2021. OIE, Geneva. Pp. 1-18.
- Pardi N, Hogan MJ, Porter FW, Weissman D. 2018. mRNA vaccines - a new era in vaccinology. *Nat Rev Drug Discov* 17: 261-279.
- Penrith ML, Kivaria FM. 2022. One hundred years of African swine fever in Africa: Where have we been, where are we now, where are we going?. *Transbound Emerg Dis* 69: e1179-e1200.
- Rose F, Wern JE, Gavins F, Andersen P, Follmann F, Foged C. 2018. A strong adjuvant based on glycol-chitosan-coated lipid-polymer hybrid nanoparticles potentiates mucosal immune responses against the recombinant Chlamydia trachomatis fusion antigen CTH522. *J Control Release* 271: 88-97.
- Sereda AD, Kazakova AS, Namsrayn SG, Vlasov ME, Sindryakova IP, Kolbasov DV. 2023. Subsequent Immunization of Pigs with African Swine Fever Virus (ASFV) Seroimmunotype IV Vaccine Strain FK-32/135 and by Recombinant Plasmid DNA Containing the CD2v Derived from MK-200 ASFV Seroimmunotype III Strain Does Not Protect from Challenge with ASFV Seroimmunotype III. *Vaccines (Basel)* 11.
- Shakya AK, Nandakumar KS. 2023. Polymer Chemistry Defines Adjuvant Properties and Determines the Immune Response against the Antigen or Vaccine. *Vaccines (Basel)* 11.
- Smith D, Cooper T, Pereira A, Jong J. 2019. Counting the cost: The potential impact of African Swine Fever on smallholders in Timor-Leste. *One Health* 8: 100109.
- Smith HA. 2000. Regulation and review of DNA vaccine products. *Dev Biol (Basel)* 104: 57-62.
- Tenaya WM, Swacita IBN, Wirata K, Damriyasa M, Besung NK, Suarsana N, Sari TK, Agustina KK. 2023. A study of African swine fever virus in Regional VI of the Disease Investigation Center of Denpasar Bali in Indonesia. *Vet World* 16: 844-850.
- Tignon M, Gallardo C, Iscaro C, Hutet E, Van der Stede Y, Kolbasov D, De Mia GM, Le Potier MF, Bishop RP, Arias M, Koenen F. 2011. Development and inter-laboratory validation study of an improved new real-time PCR assay with internal control for detection and laboratory diagnosis of African swine fever virus. *J Virol Methods* 178: 161-170.
- Tiwari S, Dhakal T, Tiwari I, Jang GS, Oh Y. 2022. Spatial proliferation of African swine fever virus in South Korea. *PLoS One* 17: e0277381.
- Tonheim TC, Bogwald J, Dalmo RA. 2008. What happens to the DNA vaccine in fish? A review of current knowledge. *Fish Shellfish Immunol* 25: 1-18.
- Zajac MD, Trujillo JD, Yao J, Kumar R, Sangewar N, Lokhandwala S, Sang H, Mallen K, McCall J, Burton L, Kumar D, Heitmann E, Burnum T, Waghela SD, Almes K, Richt J, Kim T, Mwangi W. 2023. Immunization of pigs with replication-incompetent adenovirus-vectored African swine fever virus multi-antigens induced humoral immune responses but no protection following contact challenge. *Front Vet Sci* 10: 1208275.
- Zhang H, Zhao S, Zhang H, Qin Z, Shan H, Cai X. 2023a. Vaccines for African swine fever: an update. *Front Microbiol* 14: 1139494

- Zhang M, Hong Y, Chen W, Wang C. 2017. Polymers for DNA Vaccine Delivery. *ACS Biomater Sci Eng* 3: 108-125.
- Zhang X, Yuan H, Mahmmod YS, Yang Z, Zhao M, Song Y, Luo S, Zhang XX, Yuan ZG. 2023b. Insight into the current *Toxoplasma gondii* DNA vaccine: a review article. *Expert Rev Vaccines* 22: 66-89.
- Zhao P, Wang C, Xia Y, Hu Y, Fang R, Zhao J. 2022. Seroprevalence Investigation of Classic Swine Fever Virus Before, During, and After African Swine Fever Virus Outbreak in Some Provinces of China from 2017 to 2021. *Viral Immunol* 35: 33-40.