



ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-231>

© ЧЕРНЫШЕВ Р.С., ИГОЛКИН А.С., ШОТИН А.Р., ЗИНЯКОВ Н.Г., КОЛБИН И.С., САДЧИКОВА А.С., ЛАВРЕНТЬЕВ И.А., ГРУЗДЕВ К.Н., МАЗЛУМ А., 2024

Пространственно-временной кластерный анализ циркуляции вируса африканской чумы свиней (*Asfarviridae: Asfivirus*) в Калининградской области на основе трех генетических маркеров

Чернышев Р.С., Иголкин А.С., Шотин А.Р., Зиняков Н.Г., Колбин И.С., Садчикова А.С., Лаврентьев И.А., Груздев К.Н., Мазлум А.✉

ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных», 600901, г. Владимир, Россия

Резюме

Введение. Стремительное распространение африканской чумы свиней (АЧС) в Калининградской области обуславливает необходимость использования методов молекулярной эпизоотологии для определения динамики и вектора распространения инфекции в данном субъекте России.

Цель работы – установить характер однонуклеотидного полиморфизма генов *K145R*, *O174L*, *MGF 505-5R* у изолятов вируса АЧС, выделенных в Калининградской области, и изучить циркуляцию возбудителя в странах Восточной Европы методом субгенотипирования и пространственно-временного кластерного анализа.

Материалы и методы. В качестве образцов биологического материала использовали пробы крови от живых и органов от павших домашних свиней и диких кабанов, отобранные в Калининградской области в 2017–2022 гг. Выделение вируса АЧС и идентификацию изолятов проводили в первичной культуре клеток костного мозга свиньи. Подготовку ампликонов целевых маркерных областей генома выполняли методом ПЦР с электрофоретической детекцией и последующей экстракцией фрагментов из агарозного геля. Секвенирование осуществляли по методу Сэнгера.

Результаты. Установлена циркуляция на территории субъекта-эксклава Российской Федерации вируса АЧС, принадлежащего двум генетическим кластерам: эпизоотическому (*K145R-III*, *MGF 505-5R-II*, *O174L-I* – 94,3% от изученных изолятов) и спорадическому (*K145R-II*, *MGF 505-5R-II*, *O174L-I* – 5,7%).

Заключение. Необходимо совершенствование молекулярно-эпизоотологического мониторинга генетических вариантов вируса АЧС в странах евро-азиатского континента на основе маркерных фрагментов генома внутри генотипа II, что позволит проводить наиболее детальный анализ распространения АЧС.

Ключевые слова: африканская чума свиней; генетические маркеры распространения; пространственно-временной анализ; генетические варианты; Калининградская область

Для цитирования: Чернышев Р.С., Иголкин А.С., Шотин А.Р., Зиняков Н.Г., Колбин И.С., Садчикова А.С., Лаврентьев И.А., Груздев К.Н., Мазлум А. Пространственно-временной кластерный анализ циркуляции вируса африканской чумы свиней (*Asfarviridae: Asfivirus*) в Калининградской области на основе трех генетических маркеров. *Вопросы вирусологии*. 2024; 69(3): 241–254. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-231> EDN: <https://elibrary.ru/lbevz>

Финансирование. Исследование выполнено за счет средств ФГБУ «ВНИИЗЖ» в рамках тематики научно-исследовательских работ «Ветеринарное благополучие».

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Этическое утверждение. Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с Consensus author guidelines for animal use (IAVES 23 July 2010). Протокол исследования одобрен Комиссией по биоэтике ФГБУ «ВНИИЗЖ» (протокол № Б-3/2021 от 24.05.2021).

ORIGINAL STUDY ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-231>

Spatio-temporal clustering of African swine fever virus (Asfarviridae: *Asfivirus*) circulating in the Kaliningrad region based on three genome markers

Roman S. Chernyshev, Alexey S. Igolkin, Andrey R. Shotin, Nikolay G. Zinyakov, Ivan S. Kolbin, Anastasia S. Sadchikova, Ivan A. Lavrentev, Konstantin N. Gruzdev, Ali Mazloum✉

Federal Centre for Animal Health (ARRIAH), 600901, Vladimir, Russia

Abstract

Introduction. The rapid spread of African swine fever in the Kaliningrad region makes it necessary to use the methods of molecular epidemiology to determine the dynamics and direction of ASF spread in this region of Russia. **The aim** of the study was to determine single nucleotide polymorphisms within molecular markers *K145R*, *O174L* and *MGF 505-5R* of ASFVs isolated in Kaliningrad region and to study the circulating of the pathogen in European countries by subgenotyping and spatio-temporal clustering analysis.

Materials and methods. Blood samples from living domestic pigs and organs from dead domestic pigs and wild boars, collected in the Kaliningrad region between 2017 and 2022 were used. Virus isolation was carried out in porcine bone-marrow primary cell culture. Amplicons of genome markers were amplified by PCR with electrophoretic detection and subsequent extraction of fragments from agarose gel. Sequencing was performed using the Sanger method.

Results. The circulation of two genetic clusters of ASFV isolates on the territory of the Kaliningrad has been established: epidemic (K145R-III, MGF 505-5R-II, O174L-I – 94.3% of the studied isolates) and sporadic (K145R-II, MGF 505-5R-II, O174L-I – 5.7%).

Conclusion. The broaden molecular genetic surveillance of ASFV isolates based on sequencing of genome markers is necessary in the countries of the Eurasian continent to perform a more detailed analysis of ASF spread between countries and within regions.

Keywords: African swine fever; genome markers of spread; spatio-temporal analysis; genetic variants, Kaliningrad region

For citation: Chernyshev R.S., Igolkin A.S., Shotin A.R., Zinyakov N.G., Kolbin I.S., Sadchikova A.S., Lavrentev I.A., Gruzdev K.N., Mazloum A. Spatio-temporal clustering of African swine fever virus (Asfarviridae: *Asfivirus*) circulating in the Kaliningrad region based on three genome markers. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2024; 69(3): 241–254. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-231> EDN: <https://elibrary.ru/lbevvpz>

Funding. The study was funded by the Federal Centre for Animal Health as a part of research activities «Veterinary Welfare».

Conflict of interest. The authors declare that there is no conflict of interest.

Ethics approval. Authors confirm compliance with institutional and national standards for the use of laboratory animals in accordance with Consensus author guidelines for animal use (IAVES 23 July 2010). The research protocol was approved by the Bioethics Commission of the Federal State Budgetary Institution «ARRIAH» (protocol b/n of30.04.2020).

Введение

Масштабное трансграничное распространение африканской чумы свиней (АЧС) на территории Евразии требует новых подходов к изучению циркуляции вируса. С этими целями рекомендовано проведение молекулярно-эпизоотологической кластеризации и мультигенного анализа вновь выделенных изолятов [1]. Вследствие значительной длины генома возбудителя (189 т.п.н.) возможно использование различных маркеров распространения в пространственно-временном исследовании. Большинство маркеров определяются при выявлении однонуклеотидного полиморфизма (ОНП) или различий в числе тандемных повторов (TRS), наблюдаемых в сравнительном анализе полногеномных последовательностей изолятов вируса АЧС, выделенных из биологического материала

ла от инфицированных животных (домашних свиней или диких кабанов) [2].

Мишенью для генотипирования вируса АЧС является нуклеотидная последовательность длиной 475 п.н. С-терминальной области гена *B646L*, которая традиционно использовалась для идентификации 24 генотипов [3, 4]. Вспышки АЧС в Европе и Азии вызваны генотипом II, за исключением энзоотичной ситуации на острове Сардиния (Италия), где генотип I регистрировался с 1978 г., и Китайской Народной Республики, на территории которой в 2021 г. установлен эпизоотический очаг среди домашних свиней, вызванный генотипом I [5, 6]. В 2023 г. в Китае впервые описан рекомбинантный вариант между I и II генотипами с 20 сайтами рекомбинации [7].

В связи с преобладающей циркуляцией генотипа II вируса АЧС в Евразии и обнаружением различных

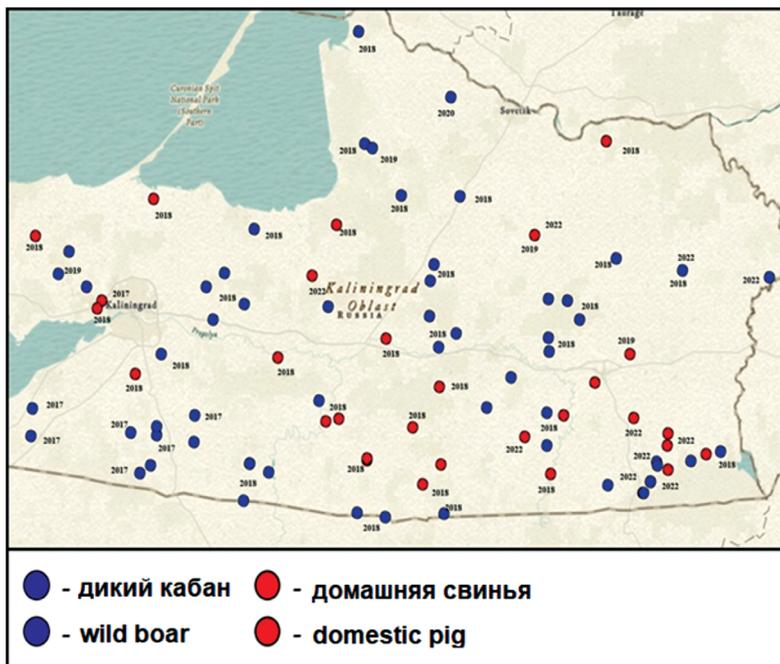


Рис. 1. Распространение АЧС на территории Калининградской области (2017–2022 гг.).
Fig. 1. Spread of ASF in the Kaliningrad region (2017–2022).

генетических вариантов, С. Gallardo и соавт. (2023) рекомендован метод, позволяющий на основе различных маркеров выделить 24 кластера (субгенотипа, генетических группы) распространения [1]. А. Mazloum и соавт. (2023) предложено 6 основных (локус *B646L*, центральная варибельная область (CVR) гена *B602L*, межгенные области *I73R/I329L* и *MGF 505-9R/10R*, гены *K145R* и *O174L*) и 7 альтернативных (межгенные области *A179L/A137R* и *C315R/C147L*, локусы *I267L*, *MGF 505-5R*, *MGF 110-7L*, *MGF 505-9R*, *MGF 360-10L*) генетических маркеров для дифференциации изолятов, принадлежащих генотипу II [2].

Кластерный генетический анализ распространения – сравнительно новый и поисковый подход для изучения АЧС в Российской Федерации. В связи с этим наиболее интересным показателем объектом исследования является эпизоотия на территории Калининградской области.

Калининградская область – субъект-эксклав России, географически расположенный в Восточной Европе. На юге граничит с Польшей, на севере и востоке – с Литвой, признанными неблагополучными по АЧС с 2014 г. [8, 9]. Первые случаи АЧС в Калининградской области отмечены в популяции дикого кабана в начале ноября 2017 г. В течение ноября–декабря 2017 г. на территории региона нотифицировано 6 эпизоотических очагов среди дикого кабана (Багратионовский район) и 1 – среди домашних свиней в личном подсобном хозяйстве (ЛПХ) гражданина, проживающего в дачном поселке Сосновка (Полесский район). В зимне-весенний период 2018 г. на территории субъекта в приграничных с Польшей районах обнаружены 6 трупов кабанов с лабораторно подтвержденным диагнозом на АЧС. С июня по сентябрь 2018 г. инфекция широко распространи-

лась среди домашних свиней в ЛПХ и нескольких свинокомплексах Калининградской области, затронув 7 ранее благополучных районов: Гвардейский (п. Суворово), Правдинский (п. Пруды, п. Новобийское, п. Белый Яр, п. Извилино, п. Красное, п. Сергеевка, п. Белкино), Черняховский (п. Пеньки, п. Глушково) и др. С ноября 2018 г. по январь 2020 г. регистрировали единичные случаи болезни [10]. В конце июля 2022 г. после 2,5 лет отсутствия вспышек зарегистрирован эпизоотический очаг АЧС в ЛПХ Нестеровского района. Всего за 2022 г. нотифицировано 16 случаев. За весь период эпизоотии на территории Калининградской области официально подтверждено 87 случаев АЧС (56 у дикого кабана и 31 у домашних свиней) (рис. 1)¹.

Ранее проведенные исследования по анализу 9 полногеномных последовательностей изолятов, выделенных в 2017–2019 гг. в Калининградской области, показали клональное развитие вспышек АЧС [11]. Так, в начале эпизоотии на территории данного региона произошла дополнительная мутация в гене *K145R*. Длительная циркуляция генетического варианта вируса с уникальным ОНП среди восприимчивых животных (диких кабанов) сформировала дивергентный пространственно-временной кластер (пул) АЧС в восточной Европе.

Энзоотическая ситуация по АЧС в Калининградской области России и дискуссия о происхождении возбудителя в восточноевропейских государствах обуслов-

¹Россельхознадзор. Эпизоотическая ситуация по АЧС в Российской Федерации, 2007–2024 г. Available at: <https://fsvps.gov.ru/wp-content/uploads/2024/02/карта-вспышек-за-2007-2024-на-05.02.png>

ливают необходимость привлечения методов молекулярной эпизоотологии в расследование вспышек.

Цель исследования – установить распространение генетических вариантов *K145R*, *MGF 505-5R*, *O174L* у статистически значимого числа изолятов вируса АЧС, циркулирующих на территории Калининградской области, и провести оценку эпизоотической ситуации на основе молекулярной кластеризации.

Материалы и методы

Изоляты вируса АЧС. Биологическим материалом для выделения вируса служили пробы органов (трубчатые кости, селезенка, лимфатические узлы) от павших домашних и диких свиней, а также кровь от живых домашних свиней, отобранные на территории Калининградской области Российской Федерации в 2017–2022 гг. и оказавшиеся положительными при исследовании методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Выделение вируса проводили в первичной культуре клеток костного мозга свињи (КМС), полученной от доноров на договорной основе [12]. После идентификации 26 изолятов их накапливали в культуре клеток КМС в титре не менее $6,5 \lg \text{ГАД}_{50}/\text{см}^3$.

Выделение ДНК и амплификация целевых фрагментов. Экстракцию тотальной ДНК выполняли из вирусодержащего культурального материала с использованием набора реагентов «ДНК-сорб В» (ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия). Амплификацию нуклеотидных участков генов *K145R*, *MGF 505-5R*, *O174L* осуществляли методом ПЦР с электрофоретической детекцией согласно ранее разработанному протоколу [13]. Выделение фрагментов из слайсов агарозного геля проводили с применением набора GeneJET Gel Extraction Kit (ThermoFisher Scientific, США).

Секвенирование. Реакцию проводили с использованием наборов Big Dye Terminator Kit версия 1.1 или 3.1 (Applied Biosystems, США) на автоматическом секвенаторе ABI Prism 3130/3130xl (Applied Biosystems, США) согласно инструкции производителя.

Выравнивание и филогенетический анализ. Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей и сравнительный анализ с другими изолятами, импортированными из Genbank (**приложение**), выполняли с применением алгоритма CLUSTAL W в программе Bioedit v. 7.2.5. При анализе учитывали последовательности целевых генов у 9 изолятов вируса АЧС из Калининградской области, опубликованных ранее [11]. Филогенез изолятов изучали с использованием компьютерной программы Mega X по рекомендованной модели методом присоединения соседей (Neighbor-Joining) с Bootstrap 1000 итерациями начальной загрузки [14].

Графическое отображение молекулярно-эпизоотических карт осуществляли в программе ArcGIS.

Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с Consensus author guidelines for animal use (IAVES 23 Ju-

ly 2010). Протокол исследования одобрен Комиссией по биоэтике ФГБУ «ВНИИЗЖ» (протокол № Б-3/2021 от 24.05.2021).

Результаты

K145R. По результатам секвенирования по Сэнгеру получен фрагмент гена *K145R* (длиной 501 п.н.) для всех 26 изолятов. Выявлено, что все идентифицированные изоляты из Калининградской области (35) имеют точечные мутации (замены) в данном фрагменте и отличаются от референтного штамма *Georgia 2007/1* (NC_044959.2) (**рис. 2 а**).

Как видно из **рис. 2 (а)**, на основе нуклеотидного выравнивания частичной последовательности гена *K145R* все исследуемые изоляты вируса АЧС можно разделить на три генетических варианта: *K145R-I*, аналогичный *Georgia 2007/1*; *K145R-II* с одной заменой $C > A$ в положении 434; *K145R-III* с двумя заменами ($C > T$ в положении 291 и $C > A$ в положении 434). Установлено, что большинство – 33 из 35 (94,3%) – изолятов, выделенных в исследуемом регионе, отнесены к генетическому варианту *K145R-III*, исключительному для этого региона. При этом 2 (5,7%) изолята *ASFV/Kaliningrad/DP2017/15355* и *ASFV/Kaliningrad/DP2022/9201* относились к *K145R-II*, ранее не регистрируемому варианту на всей территории России и характерному для стран Восточной Европы (Польша, Литва, Украина, Германия). Пространственно-временной анализ распространения вируса АЧС на основе маркера *K145R* показан на **рис. 3 (а)**.

O174L. Анализ последовательностей в 673 п.н., полученных при секвенировании фрагмента гена *O174L*, показал, что ни один (100%) из изолятов, выделенных в Калининградской области, не имел 14-нуклеотидной инсерции в положении 50–63 гена *O174L* и был идентичен референс-последовательности штамма *Georgia 2007/1* (**рис. 2 б**). Абсолютная энзоотичность варианта *O174L-I* вируса АЧС на территории Калининградской области показана на **рис. 3 (б)**.

MGF 505-5R. На основании анализа последовательности фрагмента длиной 641 п.н. у всех исследуемых образцов показано, что 100% изученных в настоящем исследовании изолятов относились к восточноевропейскому варианту *MGF 505-5R-II*, для которого была характерна несинонимичная замена $G > A$ в позиции 988 гена при сравнении с референтным штаммом II генотипа *Georgia 2007/1* (**рис. 2 в**). Географическое распространение генотипов *MGF 505-5R* вируса АЧС в Европе представлено на **рис. 3 (в)**.

Филогенетическое родство изолятов вируса АЧС из Калининградской области РФ, Польши, Литвы, Германии, Румынии и Украины представлено на укорененном дереве, выполненном комплексно на основе конкатенированной последовательности 3 маркеров: *K145R*, *MGF 505-5R* и *O174L* (**рис. 4**).

Как показано на **рис. 4**, идентифицировано две группы внутри генотипа II. Группа 1 полностью гомологична штамму *Georgia 2007/1*. Группа 2 включает 3 подгруппы: собственно 2 (соответствует генетическим вариантам *K145R-I*, *O174L-II*); 2.1 (*K145R-II*,



Рис. 2. Множественное нуклеотидное выравнивание маркерных фрагментов генов *K145R* (а), *O174L* (б) и *MGF 505-5R* (в) изолятов вируса АЧС, полученных при секвенировании по методу Сэнгера.

На рисунках показан пример выявленных ОНП или TRS и их позиции в открытой рамке считывания.

Fig. 2. Multiple nucleotide alignment of genome marker fragments *K145R* (a), *O174L* (b) and *MGF 505-5R* (c) of ASFV isolates obtained by Sanger sequencing.

The figures show an example of identified SNPs or TRSs and their position in the open reading frame.

MGF 505-5R-II, O174L-I или O174L-II) и 2.2 (K145R-III, MGF 505-5R-II, O174L-I). Для Калининградской области преимущественно характерна группа 2.2 (94,3%). В форме спорадии зарегистрирована группа 2.1 (5,7%).

Эпизоотологические данные с указанием географической локации места отбора образца, наименования изолята, даты вспышки, источника возбудителя инфекции, маркерной генетической группы представлены в **таблице** и приложении.

Обсуждение

Проведение в ФГБУ «ВНИИЗЖ» (г. Владимир) референтных диагностических исследований на АЧС обеспечило изучение изолятов, выделенных из биологического материала от домашних и диких свиней, отобранного в 35 (40,2%) очагах АЧС из 87 нотифицированных на территории Калининградской области (последовательности опубликованы в Genbank, номе-

ра доступа представлены в приложении). Большой размер статистической выборки позволяет использовать полученные результаты точечного (локального) секвенирования по Сэнгеру маркерных областей генома для анализа циркуляции вируса и формирования пространственно-временных генетических кластеров в субъекте-эксclave.

Начиная с 2016 г., вирус АЧС II генотипа, циркулирующий в странах Восточной Европы (Польша, Литва, Украина и др.), а также в Калининградской области РФ, по данным сравнительного анализа с исходным штаммом *Georgia 2007/1*, обладает нуклеотидной гетерогенностью [1]. Точечные мутации в открытых рамках считывания и межгенных областях (замены/инсерции/делеции) у вируса АЧС незначительно влияют на культуральные и иммунобиологические свойства [15–17]. При этом прикладное значение генетических изменений в молекулярной эпизоотологии

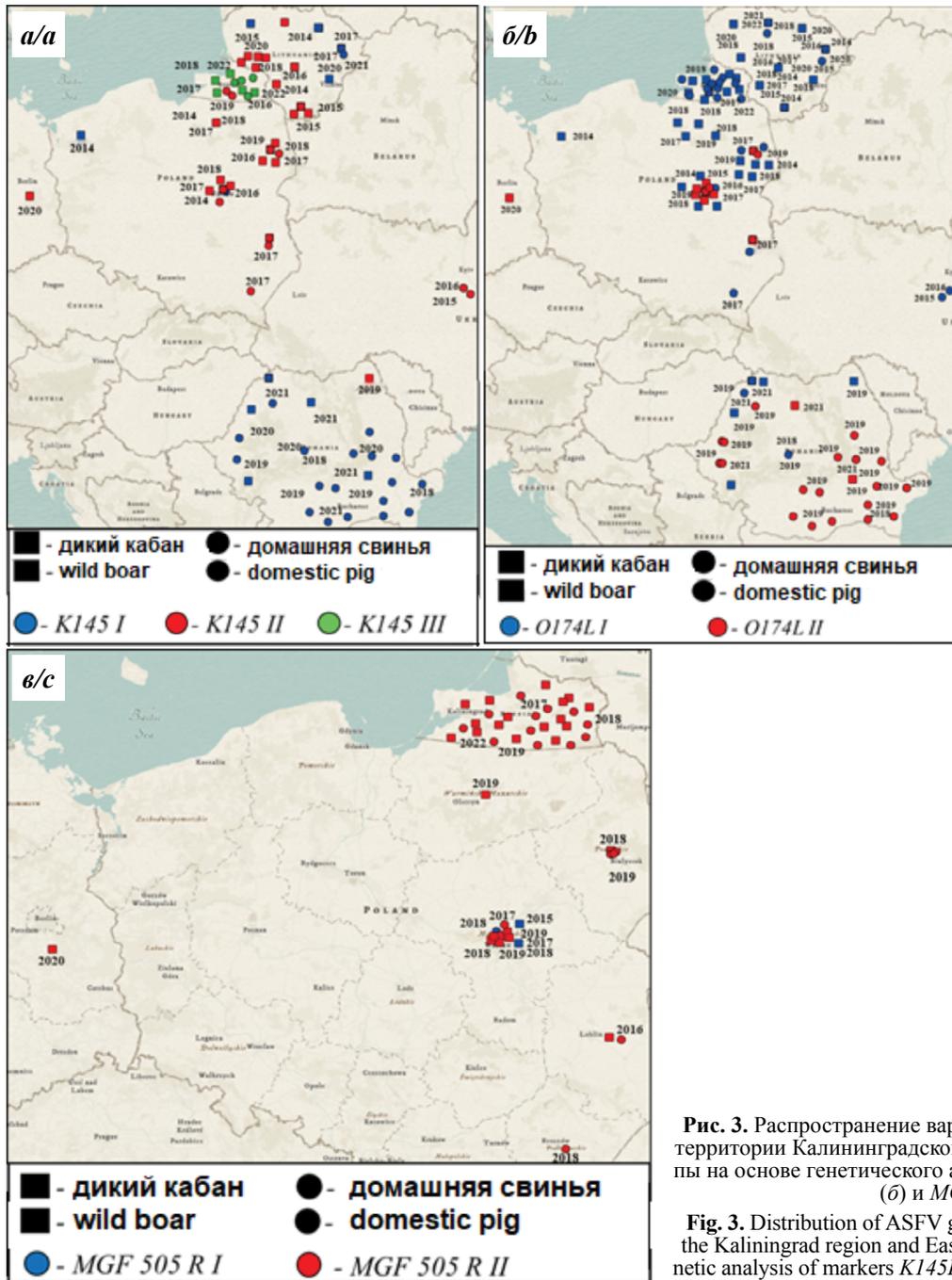


Рис. 3. Распространение вариантов вируса АЧС генотипа II на территории Калининградской области и стран Восточной Европы на основе генетического анализа маркеров *K145R* (а), *O174L* (б) и *MGF 505-5R* (в).

Fig. 3. Distribution of ASFV genotype II variants in the territory of the Kaliningrad region and Eastern European countries based on genetic analysis of markers *K145R* (a), *O174L* (b) and *MGF 505-5R* (c).

АЧС достаточно велико и постоянно актуализируется [18]. Проведение комплексного анализа таких локусов, как *K145R*, *MGF 505-5R*, *O174L*, *MGF 110-7L*, *IGR I73R/I329L*, необходимо для изучения кластеров вируса АЧС в Европе.

Ранее представленные данные показывают, что формирование генетической группы *K145R-II*, *MGF 505-5R-II*, *MGF 110-7L-II* началось в 2016 г. на территории Украины и Польши [19, 20]. Пространственно-временной массив этого кластера наблюдался в период с 2016 по 2020 г. в Польше, с июля 2017 г. по март 2022 г. в Литве. Параллельно в 2016 г. в Польше был зарегистрирован вариант

O174L-II с инсерцией в одноименном гене, которому всегда соответствует *MGF 505-5R-II* [21, 22]. При этом в отдельных случаях *O174L-II* сочетается с *K145R-II* (2016–2020 гг.), а в других – с *K145R-I* (2018–2019 гг.). Однако в Литве, Украине и Калининградской области *O174L-II* не зарегистрирован [1, 11, 20]. Десять вспышек АЧС в Румынии (2019 г.) соответствуют группе *O174L-II*, *K145R-I*, и лишь один изолят в 6 км от украинской границы отнесен к *K145R-II* и *O174L-I* [1]. В дальнейшем аналогичные изменения в геноме (*O174L-II*, *K145R-II*) отмечены у изолята вируса АЧС, выделенного от дикого кабана в Германии (2020 г.) [2].

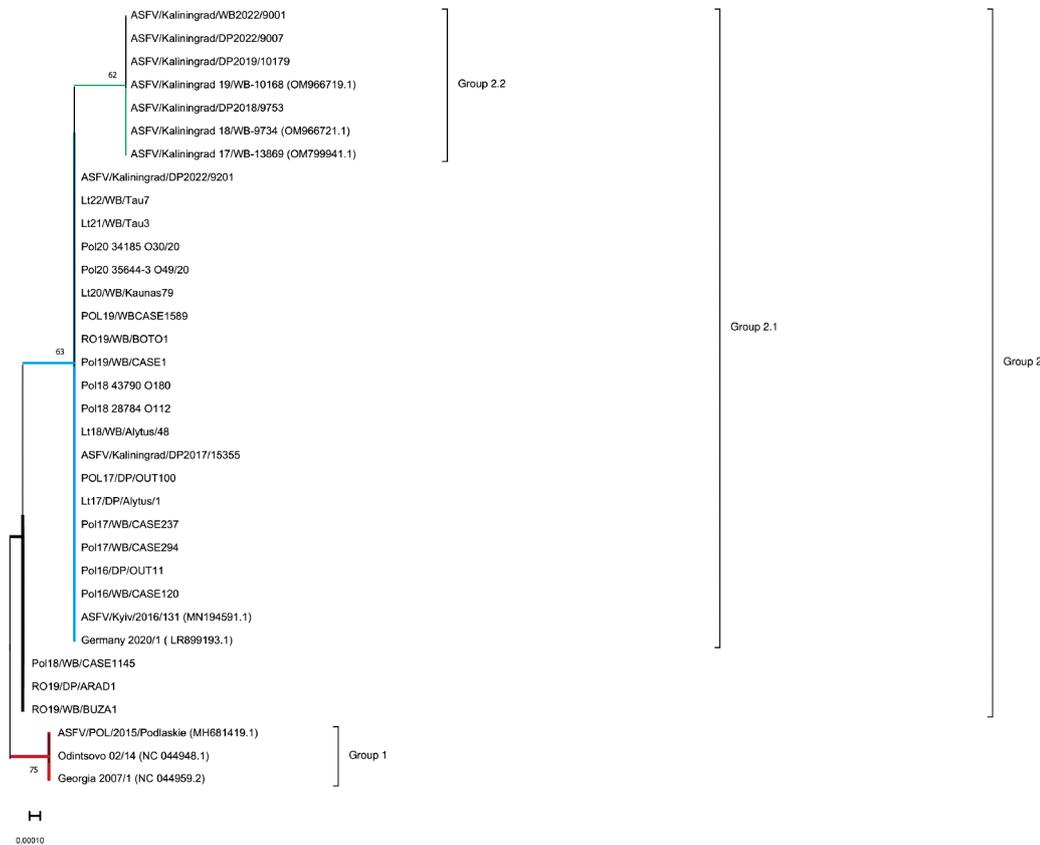


Рис. 4. Дендрограмма, построенная методом присоединения соседей (Neighbor-joining) и отображающая филогенетическое родство изолятов вируса АЧС из Восточной Европы на основе кластерного анализа.

Fig. 4. Neighbor-joining dendrogram showing phylogenomic of ASFV isolates from eastern Europe based on clustering analysis.

Вариант MGF 505-5R-II характерен для изолятов с K145R-II или K145R-III и никогда не встречался у вируса АЧС с K145R-I. Наоборот, изоляты с MGF 505-5R-I параллельно принадлежали K145R-I [21]. Появление и циркуляция вируса, принадлежащего вариантам K145R-I, O174L-II в Польше и Румынии в 2018–2019 гг., могут быть связаны с точечной репарацией гена *K145R*, имеющей тенденцию для вируса АЧС из-за наличия Pol X ДНК-полимеразы, или рекомбинацией [7, 23]. Для более глубокого изучения молекулярной эволюции вируса АЧС на территории Румынии необходимо полногеномное секвенирование изолятов с анализом гена *MGF 505-5R*.

Следует отметить, что синонимичная замена G на A в позиции 60 гена *MGF 110-7L* всегда сочеталась с вышеописанным ОНП в области MGF 505-5R [1, 11, 19, 20]. В связи с этим экономически целесообразно исследование одного из этих локусов на выбор [2].

В Калининградской области России в период с 2017 по 2022 г. сформировался уникальный кластер K145R-III, MGF 505-5R-II, O174L-I вируса АЧС. При этом замена в положении 434 гена *K145R* соответствовала обоим вариантам K145R-III и K145R-II. Однако K145R-III имел дополнительную трансверсию в позиции 291 исходного гена, следовательно являлся дочерним геновариантом от материнского K145R-II.

В проведенном исследовании установлено, что изолят *ASFV/Kaliningrad/DP2017/15355*, впервые

выделенный из биоматериала от домашних свиней в изучаемом регионе (декабрь 2017 г., Полесский р-н, п. Сосновка), относится к K145R-II, несмотря на то что первая вспышка АЧС в регионе была вызвана вирусом с K145R-III (изолят *ASFV/Kaliningrad 17/WB-13869*, полученный из биоматериала от павшего дикого кабана, обнаруженного в ноябре 2017 г. на территории Багратионовского района) [11]. Интересно, что первые случаи АЧС в Литве, вызванные вирусом с K145R-II, были зарегистрированы в июле 2017 г., а Польша и Украина в 2017 г. признаны стационарно неблагополучными [24].

В 2018–2019 гг. на территории Калининградской области зарегистрировано 65 вспышек АЧС, а все изоляты принадлежали геногруппе K145R-III, MGF 505-5R-II и O174L-I. При этом вариант K145R-II не получил распространения ввиду успешной ликвидации вспышки 2017 г. в ЛПХ гражданина Полесского района, что лимитировало переход вируса АЧС в дикую фауну. Таким образом, временем образования уникальной для региона генетической группы является осень 2017 г., а системой – европейский кабан *Sus scrofa*. При этом возможность заноса вируса АЧС в Калининградскую область в 2017 г. из других регионов России, где никогда до этого не регистрировали варианты, отличные по таким маркерам, как *K145R*, *MGF 505-5R* и *MGF 110-7L*, от штамма *Georgia 2007/1*, маловероятна [25, 26].

Таблица. Молекулярно-эпизоотологические данные об изолятах вируса АЧС, выделенных в Калининградской области 2017–2022 гг.

Table. Molecular and epizootological data on ASFVs isolated in the Kaliningrad region from 2017 to 2022

№	Наименование изолята Isolate	Место отбора образцов Place of collection	Дата регистра- ции вспышки Date of outbreak registration	Источник возбудителя инфекции Source of isolation	K145R	MGF 505-5R	O174L
1	ASFV/Kaliningrad/DP2017/15355	ЛПХ, п.Сосновка, Полесский район Private household plot, Sosnovka village, Polesky district	18.11.2017	Домашняя свинья Domestic pig	II	II	I
2	ASFV/Kaliningrad/WB2018/9737	Охотничье хозяйство, Гвардейский район Hunting farm, Gvardeysky district	03–04.07.2018	Дикий кабан Wild boar	III	II	I
3	ASFV/Kaliningrad/WB2018/9767	Лесной массив, п. Ильичево, Полесский район Forest area, Ilyichevo village, Polesky district	07–08.07.2018	Дикий кабан Wild boar	III	II	I
4	ASFV/Kaliningrad/DP2018/9716	ЛПХ, Правдинский район, п. Сергеевка Private household plot, Pravdinsky district, Sergeevka village	22.06.2018	Домашняя свинья Domestic pig	III	II	I
5	ASFV/Kaliningrad/DP2018/12537	КФХ, Неманский район, п. Жилино, ул. Дорожная, 1 Peasant farm, Nemansky district, Zhilino village, st. Dorozhnaya, 1	06–10.07.2018	Домашняя свинья Domestic pig	III	II	I
6	ASFV/Kaliningrad/WB2018/12513	Охотничье хозяйство, Черняховский район Hunting farm, Chernyakhovsky district	18.07.2018	Дикий кабан Wild boar	III	II	I
7	ASFV/Kaliningrad/DP2018/9729	ЛПХ, Правдинский район, п. Белкино Private household plot, Pravdinsky district, Belkino village	22.06.2018	Домашняя свинья Domestic pig	III	II	I
8	ASFV/Kaliningrad/WB2018/9732	п. Жаворонково, Черняховский район Zhavoronkovo village, Chernyakhovsky district	25.06.2018	Дикий кабан Wild boar	III	II	I
9	ASFV/Kaliningrad/DP2018/9728	ЛПХ, Черняховский район, п. Пеньки Private household plot, Chernyakhovsky district, Penki village	22.06.2018	Домашняя свинья Domestic pig	III	II	I
10	ASFV/Kaliningrad/WB2017/16199	Лесной массив, п. Новоселово, Багратионовский район Forest, Novoselovo settlement, Bagrationovsky district	27.11.2017	Дикий кабан Wild boar	III	II	I
11	ASFV/Kaliningrad/WB2018/12518	Лесной массив, п. Краснопо- лье, Гусевский район Forest, Krasnopolye village, Gusevsky district	30.07– 07.08.2018	Дикий кабан Wild boar	III	II	I
12	ASFV/Kaliningrad/DP2018/9723	ЛПХ, Правдинский район, п. Белый Яр Private household plot, Pravdinsky district, Bely Yar village	22.06.2018	Домашняя свинья Domestic pig	III	II	I
13	ASFV/Kaliningrad/WB2018/14814	Охотничье хозяйство, Гурьев- ский район, п. Курганы Hunting farm, Guryevsky district, Kurgany village	24.08– 03.09.2018	Дикий кабан Wild boar	III	II	I
14	ASFV/Kaliningrad/DP2018/6809	ЛПХ, Правдинский район, п. Ново-Бийское Private household plot, Pravdinsky district, Novo-Biiskoye village	08.06.2018	Домашняя свинья Domestic pig	III	II	I

Продолжение таблицы см. на стр. 249

№	Наименование изолята Isolate	Место отбора образцов Place of collection	Дата регистрации вспышки Date of outbreak registration	Источник возбудителя инфекции Source of isolation	<i>K145R</i>	<i>MGF 505-5R</i>	<i>O174L</i>
15	ASFV/Kaliningrad/DP2018/9753	Свинокомплекс IV компартмента, Правдинский район, п. Ново-Бийское Pig farm of IV compartment, Pravdinsky district, Novo-Biiskoye village	10.07.2018	Домашняя свинья Domestic pig	III	II	I
16	ASFV/Kaliningrad/DP2018/9724	ЛПХ, Правдинский район, п. Пруды Private household plot, Pravdinsky district, Prudy village	22.06.2018	Домашняя свинья Domestic pig	III	II	I
17	ASFV/Kaliningrad/DP2018/9741	Племенной завод, Славский район Breeding farm, Slavsky district	10.07.2018	Домашняя свинья Domestic pig	III	II	I
18	ASFV/Kaliningrad/DP2018/9727	ЛПХ, Правдинский район, п. Красное Private household plot, Pravdinsky district, Krasnoe village	22.06.2018	Домашняя свинья Domestic pig	III	II	I
19	ASFV/Kaliningrad/DP2018/12528	Свинокомплекс III компартмента, г. Калининград, пгт. им. А. Космодемьяненко Pig farm of compartment III, Kaliningrad, town. Them. A. Kosmodemyanenko	06–10.07.2018	Домашняя свинья Domestic pig	III	II	I
20	ASFV/Kaliningrad/DP2018/14812	ЛПХ, Гусевский район, п. Маяковское Private household plot, Gusevsky district, Mayakovskoye village	21–23.08.2018	Домашняя свинья Domestic pig	III	II	I
21	ASFV/Kaliningrad/DP2019/10179	Свинокомплекс IV компартмента, Гусевский район, п. Таманское Pig farm of compartment IV, Gusevsky district, Tamanskoye village	23.08.2019	Домашняя свинья Domestic pig	III	II	I
22	ASFV/Kaliningrad/WB2019/10169	Охотничье хозяйство, Зеленоградский район Hunting farm, Zelenogradsky district	18.05.2019	Дикий кабан Wild boar	III	II	I
23	ASFV/Kaliningrad/WB2022/8997	Охотничье хозяйство, Нестеровский район Hunting farm, Nesterovsky district	27.07.2022	Дикий кабан Wild boar	III	II	I
24	ASFV/Kaliningrad/WB2022/9001	Лесной массив вблизи п. Токаревка, Нестеровский район Forest area near the village of Tokarevka, Nesterovsky district	01.08.2022	Дикий кабан Wild boar	III	II	I
25	ASFV/Kaliningrad/DP2022/9007	ЛПХ, Нестеровский район, п. Калинино Private household plot, Nesterovsky district, Kalinino village	04.08.2022	Домашняя свинья Domestic pig	III	II	I
26	ASFV/Kaliningrad/DP2022/9201	Племенная ферма, Черняховский район, п. Покровское Breeding farm, Chernyakhovsky district, Pokrovskoye village	15.08.2022	Домашняя свинья Domestic pig	II	II	I
27	ASFV/Kaliningrad 17/WB-13869	Лесной массив, п. Красноармейское, Багратионовский район Forest, Krasnoarmeyskoye settlement, Bagrationovsky district	07.11.2019	Дикий кабан Wild boar	III	II	I
28	ASFV_Kaliningrad_18_WB-12523	Охотничье хозяйство, Славский район Hunting farm, Slavsky district	07.08.2018	Дикий кабан Wild boar	III	II	I

Продолжение таблицы см. на стр. 250

№	Наименование изолята Isolate	Место отбора образцов Place of collection	Дата регистрации вспышки Date of outbreak registration	Источник возбудителя инфекции Source of isolation	<i>K145R</i>	<i>MGF 505-5R</i>	<i>O174L</i>
29	ASFV_Kaliningrad_18_WB-12524	Лесной массив, п. Широкое, Правдинский район Forest, Shirokoe village, Pravdinsky district	30.07.2018	Дикий кабан Wild boar	III	II	I
30	ASFV_Kaliningrad_18_WB-9735	Лесной массив, Правдинский район Forest area, Pravdinsky district	03.07.2018	Дикий кабан Wild boar	III	II	I
31	ASFV_Kaliningrad_18_WB-9763	Лесной массив, п. Осиновка, Гвардейский район Forest, Osinovka village, Gvardeysky district	07.07.2018	Дикий кабан Wild boar	III	II	I
32	ASFV_Kaliningrad_18_WB-9766	Охотничье хозяйство, Полесский район Hunting farm, Polesky district	08.07.2018	Дикий кабан Wild boar	III	II	I
33	ASFV_Kaliningrad_19_WB-10168	Лесной массив, п. Заповедное, Славский район Forest, Zapovednoe village, Slavsky district	13.05.2019	Дикий кабан Wild boar	III	II	I
34	ASFV_Kaliningrad_18_WB-9734	Лесной массив, п. Каменское, Черняховский район Forest area, Kamenskoye village, Chernyakhovsky district	25.06.2018	Дикий кабан Wild boar	III	II	I
35	ASFV_Kaliningrad_18_WB-12516	Лесной массив, п. Шувалово, Черняховский район Forest area, p. Shuvalovo, Chernyakhovsky district	13.05.2018	Дикий кабан Wild boar	III	II	I

Примечание. В анализе использованы последовательности 26 изолятов, описанных впервые в текущем исследовании, и данные о 9 изолятах вируса АЧС, опубликованные ранее и импортированные из GenBank. Красным цветом выделены изоляты с генетическим вариантом *K145R-II*, зеленым цветом – с *K145R-III*.

Note. The analysis used sequences of 26 isolates described for the first time in the current study and data on 9 ASFV isolates published previously and retrieved from GenBank. Isolates with the genetic variant *K145R-II* are highlighted in red, isolates with *K145R-III* are highlighted in green.

После продолжительного отсутствия вируса с *K145R-II* (2018–2021 гг.) в Калининградской области, в 2022 г. был выделен изолят *ASFV/Kaliningrad/DP2022/9201* на крупной свиноводческой племенной ферме в поселке Покровское Черняховского района, относящийся к данному варианту. Однако в регионе *K145R-II* не был обнаружен среди зараженных диких кабанов, являющихся одним из характерных факторов распространения АЧС, включая изоляты 2022 г. [27–31]. При этом болезнь регистрировали на протяжении второй половины 2022 г. в Литве/Польше/Украине, а генетическая последовательность возбудителя в отдельных странах (Литве) соответствовала *K145R-II* и *O174L-I*² [1].

Важнейшим маркером распространения АЧС также является межгенная область *IGR I73R/I329L*. Так, на территории Польши, Калининградской области РФ и Литвы встречаются два варианта *IGR-I* (2 инсерции 10-нуклеотидных tandemных повторов, идентичные штамму *Georgia 2007/1*) и *IGR-II* (3 инсерции tandemных повторов) [1, 11]. У 7 изолятов из Вар-

миньско-Мазурского воеводства (восточный субъект Польши, граничащий с Калининградской областью), выделенных в 2019–2020 гг., обнаружены 5 инсерций tandemных повторов в межгенной области (*IGR-IV*). Все 7 образцов с *IGR-IV* принадлежали геновариантам *K145R-II*, *MGF 505-5R-II*, *O174L-I* [21]. Последующий анализ локуса *IGR I73R/I329L* у изолятов из Калининградской области актуален для подтверждения отсутствия *IGR-IV*.

Анализ данных секвенирования объективно доказывает пути молекулярной эволюции возбудителя АЧС на евро-азиатском континенте. Тенденция развития эпизоотии проявлялась смещением вспышек с юго-востока (Грузия, Армения, Азербайджан, центральная Россия) на запад (Украина, Беларусь, Польша, Литва, Латвия, Эстония, Германия, Калининградская область) в период с 2007 по 2017 г. [18]. Схема территориального происхождения и циркуляции вируса АЧС в Калининградской области, предложенная на основе пространственно-временного и филогенетического исследований, представлена на рис. 5. Молекулярно-эпизоотологическую кластеризацию на основе данных локального секвенирования также подтверждают результаты полногеномного филогенетического анализа евроазиатских изолятов, выполненного Y. Zhang и соавт. [18].

²Россельхознадзор. Количество вспышек АЧС в странах Европы 2012–2024 гг. Available at: <https://fsvps.gov.ru/files/kolichestvo-vspyshkek-achs-v-stranah-evropy-2012-2023-gg-na-05-09-2023/?ysclid=ls0x29ofky735423172>

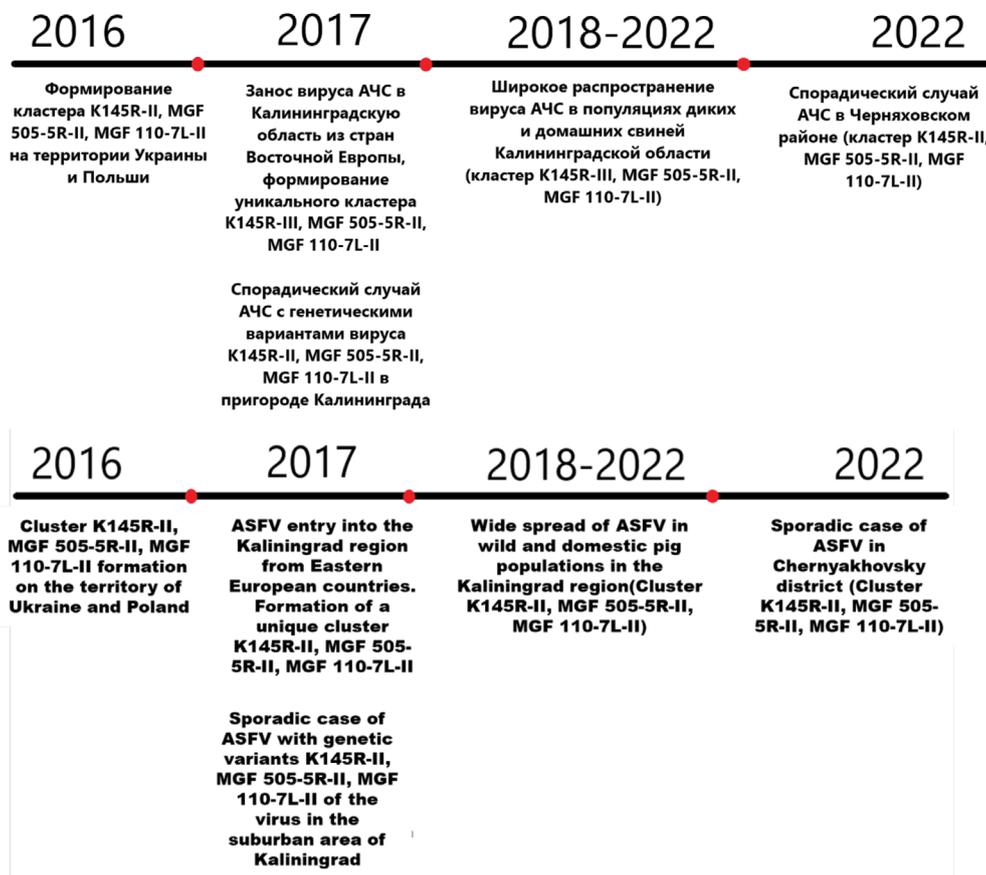


Рис. 5. Схема территориального происхождения и циркуляции вируса АЧС в Калининградской области на основе анализа опубликованных и полученных данных.

Fig. 5. The pattern of territorial origin and circulation of ASFV in Kaliningrad region based on analyses of published and original data.

Заключение

Случаи АЧС в Калининградской области Российской Федерации регистрировали в течение 2017–2022 гг. Молекулярно-генетический анализ 35 изолятов вируса, выделенных от домашних и диких свиней, продемонстрировал наличие циркуляции на территории субъекта-эксклава вируса, принадлежащего двум генетическим кластерам: эпизоотическому (K145R-III, MGF 505-5R-II, O174L-I – 94,3% от изученных изолятов) и спорадическому (K145R-II, MGF 505-5R-II, O174L-I – 5,7%). При этом второй кластер, широко распространенный в Польше и Литве, впервые описан в Калининградской области только в декабре 2017 г. – первая вспышка АЧС у домашних свиней в ЛПИХ (изолят *ASFV/Kaliningrad/DP2017/I5355*), и в августе 2022 г. – эпизоотический очаг на племенной свиноводческой ферме (*ASFV/Kaliningrad/DP2022/9201*). Показано отсутствие 14-нуклеотидной инсерции в гене *O174L* у изолятов вируса АЧС, выделенных среди восприимчивых животных Калининградской области.

Результаты проведенного пространственно-временного анализа демонстрируют маловероятную возможность заноса возбудителя АЧС в Калининградскую область в 2017 г. из центральных субъектов России, в которых наблюдается генетическая гетерогенность изолятов вируса по трем изученным маркерам.

Дальнейший мониторинг субгенотипов вируса АЧС в Евразии – весьма актуальное направление в молеку-

лярной эпизоотологии, которое может стать базовым методом и иметь прикладное значение в расследовании вспышек АЧС.

ЛИТЕРАТУРА

- Gallardo C., Casado N., Soler A., Djadjovski I., Krivko L., Madsen E., et al. A multi gene-approach genotyping method identifies 24 genetic clusters within the genotype II-European African swine fever viruses circulating from 2007 to 2022. *Front. Vet. Sci.* 2023; (10): 1112850. DOI: <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1112850>
- Mazloum A., van Schalkwyk A., Chernyshev R., Igolkin A., Heath L., Sprygin A. A guide to molecular characterization of genotype II African swine fever virus: essential and alternative genome markers. *Microorganisms.* 2023; 11(3): 642. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms11030642>
- Bastos A.D., Penrith M.L., Crucière C., Edrich J.L., Hutchings G., Roger F., et al. Genotyping field strains of African swine fever virus by partial p72 gene characterisation. *Arch. Virol.* 2003; 148(4): 693–706. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00705-002-0946-8>
- Achenbach J.E., Gallardo C., Nieto-Pelegrín E., Rivera-Arroyo B., Degefa-Negi T., Arias M., et al. Identification of a new genotype of African swine fever virus in domestic pigs from Ethiopia. *Transbound. Emerg. Dis.* 2017; 64(5): 1393–404. DOI: <https://doi.org/10.1111/tbed.12511>
- Fiori M.S., Sanna D., Scarpa F., Floris M., Di Nardo A., Ferretti L., et al. A deeper insight into evolutionary patterns and phylogenetic history of ASFV epidemics in Sardinia (Italy) through extensive genomic sequencing. *Viruses.* 2021; 13(10): 1994. DOI: <https://doi.org/10.3390/v13101994>
- Sun E., Huang L., Zhang X., Zhang J., Shen D., Zhang Z., et al. Genotype I African swine fever viruses emerged in domestic pigs in China and caused chronic infection. *Emerg. Microbes Infect.* 2021; 10(1): 2183–93. DOI: <https://doi.org/10.1080/22221751.2021.1999779>

7. Zhao D., Sun E., Huang L., Ding L., Zhu Y., Zhang J., et al. Highly lethal genotype I and II recombinant African swine fever viruses detected in pigs. *Nat. Commun.* 2023; 14(1): 3096. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-023-38868-w>
8. World Organisation for Animal Health. World Animal Health Information System. Report (2023). Available at: <https://wahis.woah.org/#/dashboards/qd-dashboard>
9. Śmietanka K., Woźniakowski G., Kozak E., Niemczuk K., Frączyk M., Bocian L., et al. African Swine Fever Epidemic, Poland, 2014–2015. *Emerg. Infect. Dis.* 2016; 22(7): 1201–7. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2207.151708>
10. Мазлум А., Шевченко И.В., Иголкин А.С., Шотин А.Р. Распространение африканской чумы свиней на территории Калининградской области. *Ветеринария Кубани.* 2022; (1): 14–8. DOI: <https://doi.org/10.33861/2071-8020-2022-1-14-18> EDN: <https://elibrary.ru/dbdygf>
11. Mazloun A., van Schalkwyk A., Shotin A., Zinyakov N., Igolkin A., Chernishev R., et al. Whole-genome sequencing of African swine fever virus from wild boars in the Kaliningrad region reveals unique and distinguishing genomic mutations. *Front. Vet. Sci.* 2023; 9: 1019808. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.1019808>
12. Puzankova O., Gavrilova V., Chernyshev R., Kolbin I., Igolkin A., Sprygin A., et al. Novel protocol for the preparation of porcine bone marrow primary cell culture for African swine fever virus isolation. *Methods Protoc.* 2023; 6(5): 73. DOI: <https://doi.org/10.3390/mps6050073>
13. Чернышев Р.С., Сидоренкова М.С., Садчикова А.С., Иголкин А.С., Мазлум А. Разработка протокола ПЦР с электрофоретической детекцией с целью амплификации маркерных областей генома изолятов вируса африканской чумы свиней. В кн.: *Труды XI Международной научно-практической конференции «Молекулярная диагностика 2023»*. М.; 2023: 576–8.
14. Kumar S., Stecher G., Li M., Niyaz C., Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 2018; 35(6): 1547–9. DOI: <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
15. Шотин А.Р., Иголкин А.С., Мазлум А., Шевченко И.В., Аронова Е.В., Груздев К.Н. Изучение биологических свойств изолята вируса африканской чумы свиней ASFV/KALININGRAD 17/WB-13869. *Сельскохозяйственная биология.* 2023; 58(4): 773–83. DOI: <https://doi.org/10.15389/agrobiolog.2023.4.773rus> EDN: <https://elibrary.ru/gwcomm>
16. Власов М.Е., Иматдинов А.Р., Титов И.А., Моргунов С.Ю., Малооголовкин А.С., Балышев В.М. Биологические свойства и молекулярно-генетическая характеристика вируса африканской чумы свиней, выделенного в 2016–2017 гг. в различных регионах Российской Федерации. *Российская сельскохозяйственная наука.* 2018; (4): 54–7. DOI: <https://doi.org/10.31857/S250026270000536-4> EDN: <https://elibrary.ru/yamjtn>
17. Gabriel C., Blome S., Blome S., Malogolovkin A., Parilov S., Kolbasov D., Teifke J.P., et al. Characterization of African swine fever virus Caucasus isolate in European wild boars. *Emerg. Infect. Dis.* 2011; 17(12): 2342–5. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid1712.110430>
18. Zhang Y., Wang Q., Zhu Z., Wang S., Tu S., Zhang Y., et al. Tracing the origin of genotype II African swine fever virus in China by genomic epidemiology analysis. *Transbound. Emerg. Dis.* 2023; 4820809. DOI: <https://doi.org/10.1155/2023/4820809>
19. Mazur-Panasiuk N., Woźniakowski G., Niemczuk K. The first complete genomic sequences of African swine fever virus isolated in Poland. *Sci. Rep.* 2019; 9(1): 4556. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36823-0>
20. Kovalenko G., Ducluzeau A.L., Ishchenko L., Sushko M., Sapachova M., Rudova N., et al. Complete genome sequence of a virulent African swine fever virus from a domestic pig in Ukraine. *Microbiol. Resour. Announc.* 2019; 8(42): e00883-19. DOI: <https://doi.org/10.1128/MRA.00883-19>
21. Mazur-Panasiuk N., Walczak M., Juszkiewicz M., Woźniakowski G. The spillover of African swine fever in Western Poland revealed its estimated origin on the basis of O174L, K145R, MGF 505-5R and IGR I73R/I329L genomic sequences. *Viruses.* 2020; 12(10): 1094. DOI: <https://doi.org/10.3390/v12101094>
22. Mazur-Panasiuk N., Woźniakowski G. The unique genetic variation within the O174L gene of Polish strains of African swine fever virus facilitates tracking virus origin. *Arch. Virol.* 2019; 164(6): 1667–72. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04224-x>
23. Redrejo-Rodríguez M., Rodríguez J.M., Suárez C., Salas J., Salas M.L. Involvement of the reparative DNA polymerase Pol X of African swine fever virus in the maintenance of viral genome stability in vivo. *J. Virol.* 2013; 87(17): 9780–7. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.01173-13>
24. Schulz K., Oļševskis E., Viltrop A., Masiulis M., Staubach C., Nurmoja I., et al. Eight Years of African Swine Fever in the Baltic States: Epidemiological Reflections. *Pathogens.* 2022; 11(6): 711. DOI: <https://doi.org/10.3390/pathogens11060711>
25. Malogolovkin A., Yelsukova A., Gallardo C., Tsybanov S., Kolbasov D. Molecular characterization of African swine fever virus isolates originating from outbreaks in the Russian Federation between 2007 and 2011. *Vet. Microbiol.* 2012; 158(3-4): 415–9. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.03.002>
26. Mazloun A., van Schalkwyk A., Shotin A., Igolkin A., Shevchenko I., Gruzdev K.N., et al. Comparative analysis of full genome sequences of African swine fever virus isolates taken from wild boars in Russia in 2019. *Pathogens.* 2021; 10(5): 521. DOI: <https://doi.org/10.3390/pathogens10050521>
27. Sauter-Louis C., Conraths F.J., Probst C., Blohm U., Schulz K., Sehl J., et al. African swine fever in wild boar in Europe – a review. *Viruses.* 2021; 13(9): 1717. DOI: <https://doi.org/10.3390/v13091717>
28. Martínez-Avilés M., Iglesias I., De La Torre A. Evolution of the ASF infection stage in wild boar within the EU (2014–2018). *Front. Vet. Sci.* 2020; 7: 155. DOI: <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00155>
29. Pautienius A., Schulz K., Staubach C., Grigas J., Zagrabskaite R., Buitkuviene J., et al. African swine fever in the Lithuanian wild boar population in 2018: a snapshot. *Virol. J.* 2020; 17(1): 148. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12985-020-01422-x>
30. Pautienius A., Grigas J., Pilevičienė S., Zagrabskaite R., Buitkuviene J., Pridotkas G., et al. Prevalence and spatiotemporal distribution of African swine fever in Lithuania, 2014–2017. *Virol. J.* 2018; 15(1): 177. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12985-018-1090-8>
31. Захарова О.И., Блохин А.А., Торопова Н.Н., Бурова О.А., Яшин И.В., Коренной Ф.И. Плотность популяции дикого кабана и распространение африканской чумы свиней в Российской Федерации. *Ветеринария сегодня.* 2022; 11(2): 104–13. DOI: <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2022-11-2-104-113> EDN: <https://elibrary.ru/dczmjk>

REFERENCES

1. Gallardo C., Casado N., Soler A., Djadjovski I., Krivko L., Madoño E., et al. A multi gene-approach genotyping method identifies 24 genetic clusters within the genotype II-European African swine fever viruses circulating from 2007 to 2022. *Front. Vet. Sci.* 2023; (10): 1112850. DOI: <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1112850>
2. Mazloun A., van Schalkwyk A., Chernyshev R., Igolkin A., Heath L., Sprygin A. A guide to molecular characterization of genotype II African swine fever virus: essential and alternative genome markers. *Microorganisms.* 2023; 11(3): 642. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms11030642>
3. Bastos A.D., Penrith M.L., Crucière C., Edrich J.L., Hutchings G., Roger F., et al. Genotyping field strains of African swine fever virus by partial p72 gene characterisation. *Arch. Virol.* 2003; 148(4): 693–706. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00705-002-0946-8>
4. Achenbach J.E., Gallardo C., Nieto-Pelegrín E., Rivera-Arroyo B., Degefa-Negi T., Arias M., et al. Identification of a new genotype of African swine fever virus in domestic pigs from Ethiopia. *Transbound. Emerg. Dis.* 2017; 64(5): 1393–404. DOI: <https://doi.org/10.1111/tbed.12511>
5. Fiori M.S., Sanna D., Scarpa F., Floris M., Di Nardo A., Ferretti L., et al. A deeper insight into evolutionary patterns and phylogenetic history of ASFV epidemics in Sardinia (Italy) through extensive genomic sequencing. *Viruses.* 2021; 13(10): 1994. DOI: <https://doi.org/10.3390/v13101994>
6. Sun E., Huang L., Zhang X., Zhang J., Shen D., Zhang Z., et al. Genotype I African swine fever viruses emerged in domestic pigs in China and caused chronic infection. *Emerg. Microbes Infect.* 2021; 10(1): 2183–93. DOI: <https://doi.org/10.1080/22221751.2021.1999779>
7. Zhao D., Sun E., Huang L., Ding L., Zhu Y., Zhang J., et al. Highly lethal genotype I and II recombinant African swine fever viruses detected in pigs. *Nat. Commun.* 2023; 14(1): 3096. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-023-38868-w>

8. World Organisation for Animal Health. World Animal Health Information System. Report (2023). Available at: <https://wahis.woah.org/#/dashboards/qd-dashboard>
9. Śmietanka K., Woźniakowski G., Kozak E., Niemczuk K., Frączyk M., Bocian Ł., et al. African Swine Fever Epidemic, Poland, 2014–2015. *Emerg. Infect. Dis.* 2016; 22(7): 1201–7. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2207.151708>
10. Mazloun A., Shevchenko I.V., Igolkin A.S., Shotin A.R. Spread of African swine fever on the territory of the Kaliningrad region. *Veterinariya Kubani.* 2022; (1): 14–8. DOI: <https://doi.org/10.33861/2071-8020-2022-1-14-18> EDN: <https://elibrary.ru/dbdygf> (in Russian)
11. Mazloun A., van Schalkwyk A., Shotin A., Zinyakov N., Igolkin A., Chernishev R., et al. Whole-genome sequencing of African swine fever virus from wild boars in the Kaliningrad region reveals unique and distinguishing genomic mutations. *Front. Vet. Sci.* 2023; 9: 1019808. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.1019808>
12. Puzankova O., Gavrilova V., Chernyshev R., Kolbin I., Igolkin A., Sprygin A., et al. Novel protocol for the preparation of porcine bone marrow primary cell culture for African swine fever virus isolation. *Methods Protoc.* 2023; 6(5): 73. DOI: <https://doi.org/10.3390/mps6050073>
13. Chernyshev R.S., Sidorenkova M.S., Sadchikova A.S., Igolkin A.S., Mazloun A. Development of a PCR protocol with electrophoretic detection to amplify marker fragments of the genome of ASFV isolates. In: *Proceedings of the XI International Scientific and Practical Conference «Molecular Diagnosis 2023»*. Moscow; 2023: 57–8. (in Russian)
14. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 2018; 35(6): 1547–9. DOI: <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
15. Shotin A.R., Igolkin A.S., Mazloun A., Shevchenko I.V., Aronova E.V., Gruzdev K.N. Biological properties of African swine fever virus ASFV/Kaliningrad 17/WB-13869. *Sel'skokhozyaystvennaya biologiya.* 2023; (4): 773–83. DOI: <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2023.4.773eng>
16. Vlasov M.E., Imatdinov A.R., Titov I.A., Morgunov S.Yu., Malogolovkin A.S., Balyshev V.M. Biological properties and molecular genetic characterization of African swine fever virus isolated in 2016–2017 in different regions of the Russian Federation. *Rossiyskaya sel'skokhozyaystvennaya nauka.* 2018; (4): 54–7. DOI: <https://doi.org/10.31857/S250026270000536-4> EDN: <https://elibrary.ru/yamjtn> (in Russian)
17. Gabriel C., Blome S., Malogolovkin A., Parilov S., Kolbasov D., Teifke J.P., et al. Characterization of African swine fever virus Caucasus isolate in European wild boars. *Emerg. Infect. Dis.* 2011; 17(12): 2342–5. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid1712.110430>
18. Zhang Y., Wang Q., Zhu Z., Wang S., Tu S., Zhang Y., et al. Tracing the origin of genotype II African swine fever virus in China by genomic epidemiology analysis. *Transbound. Emerg. Dis.* 2023; 4820809. DOI: <https://doi.org/10.1155/2023/4820809>
19. Mazur-Panasiuk N., Woźniakowski G., Niemczuk K. The first complete genomic sequences of African swine fever virus isolated in Poland. *Sci. Rep.* 2019; 9(1): 4556. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36823-0>
20. Kovalenko G., Ducluzeau A.L., Ishchenko L., Sushko M., Sapachova M., Rudova N., et al. Complete genome sequence of a virulent African swine fever virus from a domestic pig in Ukraine. *Microbiol. Resour. Announc.* 2019; 8(42): e00883-19. DOI: <https://doi.org/10.1128/MRA.00883-19>
21. Mazur-Panasiuk N., Walczak M., Juskiewicz M., Woźniakowski G. The spillover of African swine fever in Western Poland revealed its estimated origin on the basis of O174L, K145R, MGF 505-5R and IGR 173R/I329L genomic sequences. *Viruses.* 2020; 12(10): 1094. DOI: <https://doi.org/10.3390/v12101094>
22. Mazur-Panasiuk N., Woźniakowski G. The unique genetic variation within the O174L gene of Polish strains of African swine fever virus facilitates tracking virus origin. *Arch. Virol.* 2019; 164(6): 1667–72. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04224-x>
23. Redrejo-Rodríguez M., Rodríguez J.M., Suárez C., Salas J., Salas M.L. Involvement of the reparative DNA polymerase Pol X of African swine fever virus in the maintenance of viral genome stability in vivo. *J. Virol.* 2013; 87(17): 9780–7. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.01173-13>
24. Schulz K., Olševskis E., Viltrop A., Masiulis M., Staubach C., Nurmoja I., et al. Eight Years of African Swine Fever in the Baltic States: Epidemiological Reflections. *Pathogens.* 2022; 11(6): 711. DOI: <https://doi.org/10.3390/pathogens11060711>
25. Malogolovkin A., Yelsukova A., Gallardo C., Tsybanov S., Kolbasov D. Molecular characterization of African swine fever virus isolates originating from outbreaks in the Russian Federation between 2007 and 2011. *Vet. Microbiol.* 2012; 158(3–4): 415–9. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.03.002>
26. Mazloun A., van Schalkwyk A., Shotin A., Igolkin A., Shevchenko I., Gruzdev K.N., et al. Comparative analysis of full genome sequences of African swine fever virus isolates taken from wild boars in Russia in 2019. *Pathogens.* 2021; 10(5): 521. DOI: <https://doi.org/10.3390/pathogens10050521>
27. Sauter-Louis C., Conraths F.J., Probst C., Blohm U., Schulz K., Sehl J., et al. African swine fever in wild boar in Europe – a review. *Viruses.* 2021; 13(9): 1717. DOI: <https://doi.org/10.3390/v13091717>
28. Martínez-Avilés M., Iglesias I., De La Torre A. Evolution of the ASF infection stage in wild boar within the EU (2014–2018). *Front. Vet. Sci.* 2020; 7: 155. DOI: <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00155>
29. Pautienius A., Schulz K., Staubach C., Grigas J., Zagrabskaite R., Buitkuvienė J., et al. African swine fever in the Lithuanian wild boar population in 2018: a snapshot. *Virol. J.* 2020; 17(1): 148. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12985-020-01422-x>
30. Pautienius A., Grigas J., Pileviciene S., Zagrabskaite R., Buitkuvienė J., Pridotkas G., et al. Prevalence and spatiotemporal distribution of African swine fever in Lithuania, 2014–2017. *Virol. J.* 2018; 15(1): 177. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12985-018-1090-8>
31. Zakharova O.I., Blokhin A.A., Toropova N.N., Burova O.A., Yashin I.V., Korennoy F.I. Density of wild boar population and spread of African swine fever in the Russian Federation. *Veterinariya segodnya.* 2022; 11(2): 104–13. DOI: <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2022-11-2-104-113> EDN: <https://elibrary.ru/dczmjnk> (in Russian)

Информация об авторах:

Чернышев Роман Сергеевич – аспирант, ветеринарный врач референтной лаборатории по африканской чуме свиней ФГБУ «ВНИИЗЖ», Владимир, Россия. E-mail: chernishev_rs@arriah.ru; <https://orcid.org/0000-0003-3604-7161>

Иголкин Алексей Сергеевич – канд. вет. наук, заведующий референтной лабораторией по африканской чуме свиней ФГБУ «ВНИИЗЖ», Владимир, Россия. E-mail: igolkin_as@arriah.ru; <https://orcid.org/0000-0002-5438-8026>

Шотин Андрей Романович – канд. вет. наук, научный сотрудник референтной лаборатории по африканской чуме свиней ФГБУ «ВНИИЗЖ», Владимир, Россия. E-mail: shotin@arriah.ru; <https://orcid.org/0000-0001-9884-1841>

Зиняков Николай Геннадьевич – канд. биол. наук, старший научный сотрудник референтной лаборатории вирусных болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ», Владимир, Россия. E-mail: zinyakov@arriah.ru; <https://orcid.org/0000-0002-3015-5594>

Колбин Иван Сергеевич – аспирант, ветеринарный врач референтной лаборатории по африканской чуме свиней ФГБУ «ВНИИЗЖ», Владимир, Россия. E-mail: kolbin@arriah.ru; <https://orcid.org/0000-0003-4692-1297>

Садчикова Анастасия Сергеевна – аспирант, ветеринарный врач референтной лаборатории по африканской чуме свиней ФГБУ «ВНИИЗЖ», Владимир, Россия. E-mail: sadchikova@arriah.ru; <https://orcid.org/0009-0001-0801-2394>

Лаврентьев Иван Андреевич – аспирант, ведущий ветеринарный врач референтной лаборатории по африканской чуме свиней ФГБУ «ВНИИЗЖ», Владимир, Россия. E-mail: lavrentev@arriah.ru; <https://orcid.org/0009-0003-0552-3812>

Груздев Константин Николаевич – д-р биол. наук, профессор, главный научный сотрудник информационно-аналитического центра ФГБУ «ВНИИЗЖ», Владимир, Россия. E-mail: gruzdev@arriah.ru; <https://orcid.org/0000-0003-3159-1969>

Мазлум Али  – канд. биол. наук, старший научный сотрудник референтной лаборатории по африканской чуме свиней ФГБУ «ВНИИЗЖ», Владимир, Россия. E-mail: mazlum@arriah.ru; <https://orcid.org/0000-0002-5982-8393>

Участие авторов: Чернышев Р.С., Иголкин А.С., Мазлум А. – концепция и дизайн исследования; Чернышев Р.С., Зиняков Н.Г., Колбин И.С., Садчикова А.С. – проведение экспериментов; Чернышев Р.С., Иголкин А.С., Шотин А.Р., Лаврентьев И.А., Мазлум А. – сбор и обработка материала; Чернышев Р.С., Мазлум А. – написание текста; Иголкин А.С., Шотин А.Р., Зиняков Н.Г., Груздев К.Н. – редактирование.

Поступила 16.02.2024

Принята в печать 12.04.2024

Опубликована 30.06.2024

Information about the authors:

Roman S. Chernyshev – postgraduate student, reference laboratory for ASF FGBI «ARRIAH», Vladimir, Russia. E-mail: chernishev_rs@arriah.ru; <https://orcid.org/0000-0003-3604-7161>

Alexey S. Igolkin – Head of reference laboratory for ASF FGBI «ARRIAH», Vladimir, Russia. E-mail: igolkin_as@arriah.ru; <https://orcid.org/0000-0002-5438-8026>

Andrey R. Shotin – researcher, reference laboratory for ASF FGBI «ARRIAH», Vladimir, Russia. E-mail: shotin@arriah.ru; <https://orcid.org/0000-0001-9884-1841>

Nikolay G. Zinyakov – senior researcher, reference laboratory for avian influenza FGBI «ARRIAH», Vladimir, Russia. E-mail: zinyakov@arriah.ru; <https://orcid.org/0000-0002-3015-5594>

Ivan S. Kolbin – postgraduate student, reference laboratory for ASF FGBI «ARRIAH», Vladimir, Russia. E-mail: kolbin@arriah.ru; <https://orcid.org/0000-0003-4692-1297>

Anastasia S. Sadchikova – postgraduate student, reference laboratory for ASF FGBI «ARRIAH», Vladimir, Russia. E-mail: sadchikova@arriah.ru; <https://orcid.org/0009-0001-0801-2394>

Ivan A. Lavrentev – postgraduate student, reference laboratory for ASF FGBI «ARRIAH», Vladimir, Russia. E-mail: lavrentev@arriah.ru; <https://orcid.org/0009-0003-0552-3812>

Konstantin N. Gruzdev – Doctor of Biological Sciences, Professor, Chief Researcher of the Information and Analytical Center FGBI «ARRIAH», Vladimir, Russia. E-mail: gruzdev@arriah.ru; <https://orcid.org/0000-0003-3159-1969>

Ali Mazloun  – Senior researcher, reference laboratory for ASF FGBI «ARRIAH», Vladimir, Russia. E-mail: mazlum@arriah.ru; <https://orcid.org/0000-0002-5982-8393>

Contribution: Chernyshev R.S., Igolkin A.S., Mazloun A – research concept and design; Chernyshev R.S., Zinyakov N.G., Kolbin I.S., Sadchikova A.S. – performing of the laboratory research; Chernyshev R.S., Igolkin A.S., Shotin A.R., Lavrentiev I.A., Mazloun A. – collection and processing of the material; Chernyshev R.S., Mazloun A. – writing of the text; Igolkin A.S., Shotin A.R., Zinyakov N.G., Gruzdev K.N. – editing of the article.

Received 16 February 2024

Accepted 12 April 2024

Published 30 June 2024